



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

KEBERADAAN *Escherichia coli* RESISTAN ANTIBIOTIK PADA IKAN BALANG (*Pristolepis fasciata*) DI SUNGAI BATANG ARAU

SKRIPSI



**Maharani Hazar
07132017**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2012**

ABSTRAK

KEBERADAAN *Escherichia coli* RESISTAN ANTIBIOTIK PADA IKAN BALANG (*Pristolepis fasciata*) DI SUNGAI BATANG ARAU

Oleh :

Maharani Hazar

Sarjana Sains (SSi) dalam bidang Kimia Fakultas MIPA Universitas Andalas
Dibimbing oleh Marniati Salim, M.S dan Elida Mardiah, M.S

Penelitian mengenai resistansi antibiotik terhadap bakteri *Escherichia coli* (*E.coli*) dan jumlah bakteri koliform dari Ikan Balang di Sungai Batang Arau telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan *E.coli* patogen yang resistan terhadap antibiotik dan jumlah bakteri tersebut pada Ikan Balang. Uji kualitatif bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan metoda MPN (Most Probable Number). Berdasarkan metoda ini didapatkan jumlah bakteri koliform dan feecal koliform (*E.coli*) adalah ≥ 2400 MPN/100 mL. Dari medium Endo Agar, diambil lima kultur yang diuji secara biokimia. Uji laktosa dan uji indol menunjukkan hasil positif sedangkan uji sitrat menunjukkan nilai negatif. Berdasarkan uji ini kelima kultur positif, bakteri *Escherichia coli*. Kultur yang didapatkan dari hasil isolasi bakteri *Escherichia coli*, diuji resistansi dengan metoda difusi dengan antibiotik *amoxicilin*, *ampicilin*, *tetracycline* dan *chrolamphenicol*. Halozone terbesar diperoleh pada antibiotik *amoxicilin*. Pola resistansi antibiotik terhadap *Escherichia coli*, dalam persen adalah 30% kultur resistant, 45% intermediet dan 25% susceptible terhadap keempat antibiotik. Hasil amplifikasi menunjukkan tidak ditemukanya gen *stx₁* yang menandai adanya bakteri *Escherichia coli* O157:H7 terhadap kelima kultur.

ABSTRACT

PREVALENCE OF *Escherichia coli* ANTIBIOTIC RESISTANT IN BALANG FISH AT BATANG ARAU RIVER

By :

Maharani Hazar

Bachelor of Science in Chemistry Faculty of Mathematics and Natural Science

University of Andalas

Advised by Marniati Salim, M.S dan Elida Mardiah, M.S

Research on antibiotic resistance of *Escherichia coli* (*E. coli*) and the number of coliform bacteria obtained from Balang fish at Batang Arau River have been done. This study aims to determine the presence of pathogenic *E. coli* which is resistant to antibiotics and the amount of bacteria in Balang fish. The qualitative assay of *Escherichia coli* has done by using MPN method (Most Probable Number). Based on this method the number of coliform bacteria and fecal coliform (*E.coli*) which can be obtained is ≥ 2400 MPN/100 mL. Five cultures from Endo Agar was carried to biochemical assay. The results of biochemical assay is indole test and lactose test are positive, while citrate test is negative. Based on this test the five cultures are positive *Escherichia coli*. Cultures obtained from the isolation of *Escherichia coli* were resistance tested by the diffusion method using antibiotic amoxicilin, ampicilin, tetracycline and chrolamphenicol. Largest halozone was shown in amoxicilin. The patterns of antibiotic resistance of *Escherichia coli* in percent is 30% culture resistant, 45% intermediate and 25% susceptible to all four antibiotics. The results shows no amplification of the *stx₁* gene which is indicating no bacteria *Escherichia coli* O157: H7 in these five cultures.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan makalah hasil yang berjudul “Keberadaan *Escherichia coli* Resistan Antibiotik Pada Ikan Balang di Sungai Batang Arau”. Penyusunan makalah ini merupakan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S1) pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas. Dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapatkan masukan dan bantuan serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibu Marniati Salim, M.S. dan Ibu Elida Mardiah, M.S. sebagai dosen pembimbing yang telah bersedia memberikan bimbingan, arahan, motivasi dan bantuan kepada penulis.
2. Bapak Dr. Adlis Santoni sebagai Ketua Jurusan Kimia dan Bapak Dr. Mai Efdi sebagai Koordinator Pendidikan Jurusan Kimia FMIPA UNAND.
3. Ibu Olly Norita Tetra, M.Si sebagai Pembimbing Akademik.
4. Staf pengajar Jurusan Kimia, Pegawai Jurusan Kimia, serta Analis Laboratorium kimia.
5. Rekan-rekan SO_CH4 07, Laboratorium Bioteknologi Kimia dan Laboratorium Pemuliaan dan Bioteknologi Fakultas Pertanian

Penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan di masa mendatang. Semoga skripsi ini bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan. Akhir kata penulis mohon maaf bila ada kesalahan dalam penulisan skripsi ini.

Padang, April 2012

Hormat Penulis

Maharani Hazar

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN

ABSTRAK

ABSTRACT

KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	ii
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Rumusan Masalah	3
1.4. Manfaat Penelitian	3

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ikan Sebagai Indikator Pencemaran.....	4
2.1.1. Ikan sebagai Indikator Pencemaran dan Sumber Bakteri Patogen.	4
2.1.2. Ikan Balang (<i>Pristolepis fasciata</i> Blkr)	4
2.2. <i>Escherichia coli</i>	5
2.2.1. Morfologi dan Taksonomi <i>Escherichia coli</i>	6
2.2.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7.	7
2.2.3. Karakteristik <i>E.coli</i> O157:H7.	8
2.2.4. Serotipe <i>E. coli</i> O157:H7.....	8
2.2.5. Epidemiologi dan Kasus <i>E. coli</i> O157:H7.....	8
2.2.6. Virulensi dan Patogenitas gen <i>eae, stx₁, stx₂</i>	10
2.3. Antibiotik	11
2.3.1. Mekanisme Kerja Antibiotik.....	11
2.3.2. Antibiotik untuk Penanganan diare	12
2.3.3. Resistensi Antibiotik.	13
2.3.4. Kategori Hasil tes sensitifitas antimikroba.	15

2.3.5. Kejadian Resistansi Antibiotik.....	15
2.4. Elektroforesa Gel	17
2.5. <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR)	18
2.5.1. Komponen Dasar PCR.	19
2.5.2. Siklus Kerja PCR.	20

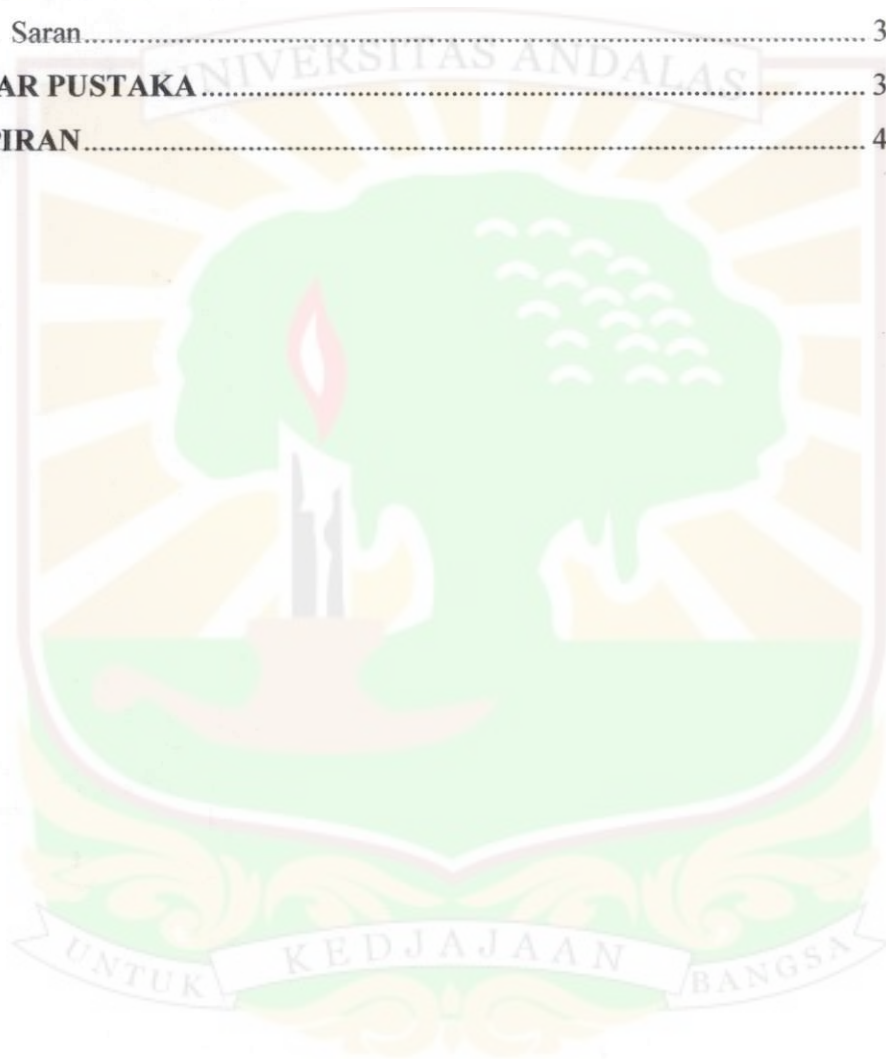
III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.2. Alat dan Bahan	22
3.3. Pembuatan Medium	22
3.3.1. Medium <i>Lactose Broth Single Strength</i> (LBSS)	22
3.3.2. Medium <i>Lactose Broth Double Strength</i> (LBDS)	22
3.3.3. Medium <i>Brilliant Green Bile lactose Broth</i> (BGLBB).....	23
3.3.4. Medium Endo Agar.....	23
3.3.5. Medium <i>Tryptose Soy Agar</i> (TSA)	23
3.3.6. Medium Muller Hinton Agar	23
3.3.7. Medium Luria Bertani Broth.....	23
3.3.8. Medium Tryptone Agar.....	23
3.3.9. Medium <i>Simmon Citrate</i>	23
3.4. Pengambilan Sampel.....	23
3.5. Isolasi <i>Escherichia coli</i> dan Uji Kualitatif Koliform.....	24
3.5.1. Uji Kualitatif Koliform (Metoda MPN).....	24
3.5.2. Uji Kualitatif Fecal Koliform.....	24
3.5.3. Isolasi <i>Escherichia coli</i>	24
3.5.4. Pemurnian <i>Escherichia coli</i>	24
3.6. Uji Biokimia <i>Escherichia</i>	24
3.7. Uji Resistansi terhadap antibiotik.	25
3.8. Isolasi DNA dan Karakterisasi <i>Strain Escherichia coli</i>	26
3.9. Elektroforesis.	27

IV. HASIL DAN PEMBAHSAN

4.1. Isolasi <i>Escherichia coli</i>	28
4.1.1. Uji Kualitatif Koliform (Metoda MPN).....	28
4.1.2. Uji Kualitatif Fecal Koliform.....	29

4.1.3. Isolasi <i>Escherichia coli</i>	30
4.1.4. Pemurnian <i>Escherichia coli</i>	31
4.2. Uji Biokimia Bakteri <i>Escherichia coli</i>	31
4.3. Uji Resistansi terhadap Antibiotik	32
4.4. Isolasi DNA dan Karakterisasi Strain <i>Esherichia coli</i>	35
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan	37
5.2. Saran.....	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	41

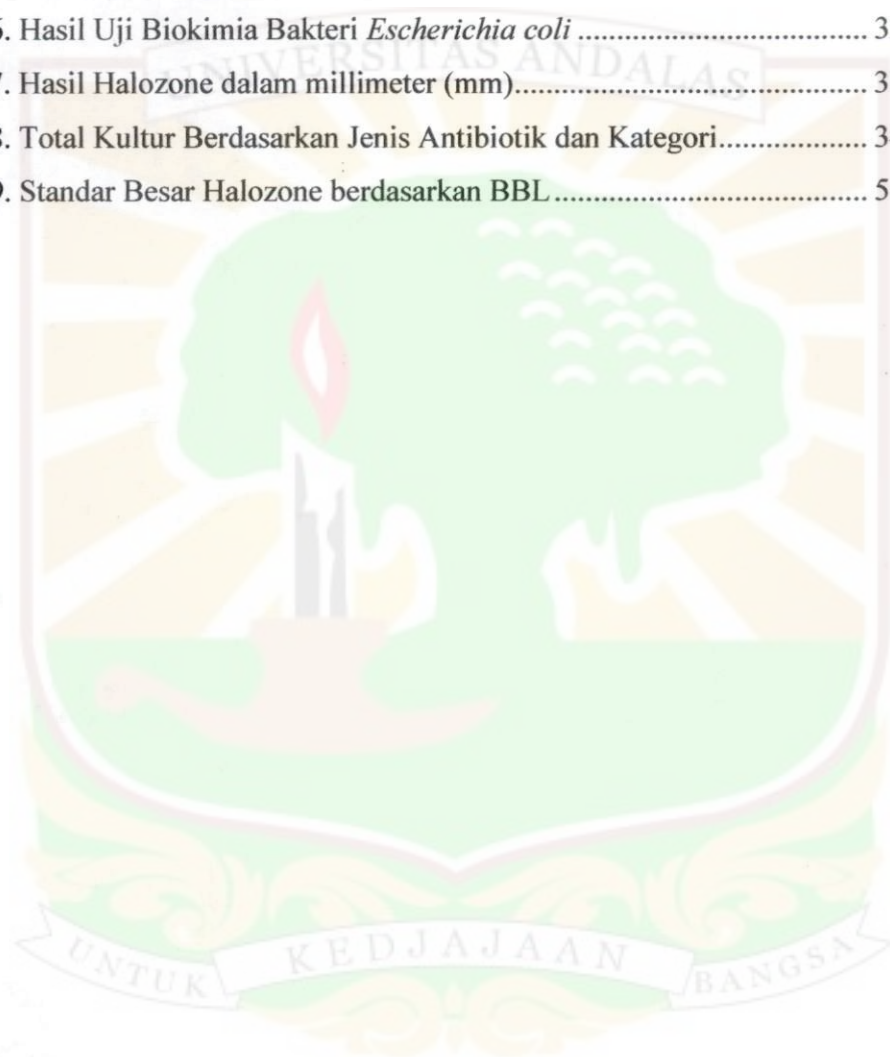


DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Ikan Balang (<i>Pristopelis fasciata</i>).....	5
Gambar 2. <i>E.coli</i> O157:H7 pada medium CHROMagar™ O157	8
Gambar 3. Skema Amplifikasi DNA dalam PCR	21
Gambar 4. <i>E.coli</i> pada medium Endo Agar untuk B1 dan B3	30
Gambar 5. Pemurnian <i>E.coli</i> pada medium TSA	31
Gambar 6. Uji Resistansi bakteri <i>E.coli</i> pada C1 dan C3	33
Gambar 7. (a) Hasil elektroforesis Isolasi DNA <i>E.coli</i> (b) Hasil amplifikasi lima kultur <i>E.coli</i>	35
Gambar 8. Lokasi Pengambilan Sampel	51
Gambar 9. <i>E.coli</i> pada medium Endo Agar.	49
Gambar 10. Pemurnian <i>E.coli</i> pada medium TSA.....	49
Gambar 11. Uji Indol.	51
Gambar 12. Uji Laktosa.	51
Gambar 13. Uji Sitrat.....	52
Gambar 14. Uji Resistansi bakteri <i>E.coli</i>	53

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Daftar Konsentrasi Antibiotik yang digunakan	25
Tabel 2. Komponen-Komponen PCR	26
Tabel 3. Tahapan Kerja Mesin PCR	27
Tabel 4. Hasil Uji Kualitatif Koliform dengan Metoda MPN	28
Tabel 5. Hasil uji Kualitatif Fecal Koliform	29
Tabel 6. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>Escherichia coli</i>	32
Tabel 7. Hasil Halozone dalam millimeter (mm).....	33
Tabel 8. Total Kultur Berdasarkan Jenis Antibiotik dan Kategori.....	34
Tabel 9. Standar Besar Halozone berdasarkan BBL	54



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Uji Kualitatif Koliform (Metoda MPN) dan Isolasi <i>E.coli</i>	41
Lampiran 2. Skema Kerja Uji Resistansi Antibiotik.....	43
Lampiran 3. Skema Kerja Isolasi DNA	44
Lampiran 4. Skema Kerja Pendeteksian gen <i>stx₁</i> pada <i>E.coli</i>	45
Lampiran 5. Lokasi Pengambilan Sampel	46
Lampiran 6. Tabel MPN	47
Lampiran 7. Isolasi dan Pemurnian <i>Escherichia coli</i>	49
Lampiran 8. Flowchart Bergey's manual of Deteminative Bacterology	50
Lampiran 9. Uji Biokimia <i>Escherichia coli</i>	51
Lampiran 10. Uji Resistansi Antibiotik	53
Lampiran 11. Standar Antibiotik.....	54
Lampiran 12. Standar SNI (Standar Nasional Indonesia) 7388:2009	55

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sebagai sumber protein, ikan merupakan salah satu sumber makanan yang murah, dan mudah didapatkan. Di Indonesia umumnya dan Padang khususnya, masyarakat dengan mudah mendapatkan ikan hanya dengan memancing di sungai, ada yang sekedar hobi dan juga sebagai mata pencaharian penduduk disekitar sungai. Di Padang, Sungai Batang Arau yang merupakan salah satu sungai besar, telah dicemari oleh limbah Rumah sakit dan aktifitas manusia (kotoran manusia, pertambangan, persawahan, pemukiman dan industri). Sungai Batang Arau telah mengalami pendangkalan dan pencemaran, sehingga sungai ini tidak dapat lagi digunakan untuk mandi, mencuci, apalagi konsumsi oleh masyarakat ^{1,2}. Dengan kondisi perairan seperti ini, diduga mengandung mikroorganisme yang patogen terhadap manusia.

Infeksi yang terjadi pada manusia yang disebabkan oleh bakteri patogen yang dibawa oleh ikan atau air, cukup umum terjadi, hal ini tergantung dari musim, kontak ikan dengan manusia, lingkungan dan sistem kekebalan tubuh manusia. Bakteri patogen yang umum ditemukan pada pencemaran adalah kelompok koliform dan feacal koliform, contohnya: *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp* dan *Enterococci*. Kelompok bakteri ini digunakan sebagai indikator pencemaran pada makanan dan minuman. Salah satu bakteri patogen yang menjadi perhatian akhir ini adalah *E.coli* O157:H7, penyebab diare berdarah, kram perut, gagal ginjal dan menyebabkan kematian mikroflora pada usus. Bakteri ini juga dapat ditemukan pada feses ayam, kambing, domba, babi, anjing dan kucing. ^{3,4}

Salah satu pencemaran berasal dari limbah, antibiotik merupakan salah satu limbah rumah sakit. Limbah antibiotik memerlukan penanganan yang khusus dalam metoda pembuanganya. Tidak seperti limbah farmasi lainnya, limbah antibiotik tidak dapat dibuang melalui saluran pembuangan yang langsung mengenai badan air. Selain itu limbah rumah sakit yang berasal dari infeksius, memiliki mikroorganisme patogen yang berbahaya ⁵. Rumah sakit yang terdapat di Padang belum memiliki sistem penanganan limbah yang sesuai dengan ketentuan yang berlaku. Sehingga limbah-limbah rumah sakit banyak yang mencemari badan air yang menyebabkan berkembangnya bakteri patogen yang berinteraksi dengan antibiotik. ⁶

Penelitian yang dilakukan oleh Kumar pada tahun 2005 di India, didapatkan 116 strain *E.coli* dan diuji resistansinya dengan 14 antibiotik yang berbeda-beda. 7 strain resistan terhadap lebih dari lima antibiotik yang mana salah satunya resistan terhadap 8 antibiotik. Penelitian ini dilakukan di India yang merupakan negara berkembang, sama seperti Indonesia dengan tingkat populasi yang besar. Sampel berupa ikan, udang dan kerang diambil dari pasar dan tambak ikan yang bertempat pada muara sungai. Di muara sungai ini sanitasinya buruk dan di sepanjang sungai dicemari oleh aktivitas manusia (rumah sakit, perumahan penduduk).⁷

Pada manusia, penggunaan antibiotika di Indonesia yang cukup dominan adalah turunan tetrasiklin, penisilin, kloramfenikol yang mudah didapatkan di apotik tanpa resep dokter. Pola penggunaan antibiotika tersebut telah mencapai tingkat yang berlebihan dan banyak diantaranya digunakan secara tidak tepat. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Universitas Gajah Mada di lima wilayah antara lain Sumatera Barat, dan daerah lainya terungkap pemberian antibiotik dilakukan tenaga kesehatan sekitar 87 persen untuk pasien yang terkena diare dan 92-94 persen untuk ISPA (infeksi saluran pernafasan akut). Selain pada manusia, antibiotik juga digunakan untuk hewan ternak (peternakan) dan agrikultural^{7,8,9}

Resistensi antibiotik yang terjadi berhubungan dengan makanan dan telah menjadi perhatian dunia Perkembangan resistensi kuman terhadap antibiotika sangat dipengaruhi oleh intensitas pemaparan antibiotika di suatu wilayah, tidak terkendalinya penggunaan antibiotika cenderung akan meningkatkan resistensi kuman yang semula sensitif. Hubungan antara penggunaan anti mikroba dan terjadinya resistensi telah diterima secara luas. Antimikroba menggunakan tekanan selektif pada mikroorganisme dan karena itu penggunaannya dianggap sebagai kunci dalam studi epidemiologi. Ancaman penyakit dari strain bakteri yang pathogen yang resisten terhadap antibiotik telah meningkat dalam beberapa tahun terakhir. Resistensi antimikroba dapat menyebar melalui transfer horizontal pada gen yang resisten dari satu jenis bakteri yang lain. Beberapa bakteri mempunyai kemampuan alami untuk kebal atau resisten terhadap obat, misalnya dengan antibiotik meskipun tidak berinteraksi secara langsung⁷.

Oleh karena itu dianggap penting untuk mempelajari jumlah bakteri koliform dan resistensi antibiotik pada bakteri patogen (*Escherichia coli*) yang terdapat pada

salah satu sumber makanan yaitu ikan yang terdapat Sungai Batang Arau Padang, Sumatera Barat, serta mendeteksi gen *stx₁* yang menandai *Escherichia coli* O157:H7 pada *Escherichia coli* patogen yang didapatkan.

1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat pencemaran Bakteri koliform dan resistansi antibiotik pada *Escherichia coli* yang terjadi di perairan kota Padang, yaitu di Sungai Batang Arau serta mendeteksi adanya gen *stx₁* pada *Escherichia coli* patogen tersebut

1.3 Rumusan Masalah

Akibat tingginya tingkat pencemaran oleh aktifitas manusia didaerah Sungai Batang Arau Ganting, diduga terjadi resistensi bakteri *Escherichia coli*. Dalam penelitian ini akan diuji resistensi antibiotik terhadap bakteri *Escherichia coli* pada ikan yang ada diperairan tersebut dan jumlah bakteri koliform, serta pendeteksian gen *stx₁* *Escherichia coli* O157:H7 yang mejadi perhatian ilmuwan akhir ini.

1.4 Manfaat

Setelah didapatkan tingkat tingkat pencemaran kotoran manusia dan resistansi antibiotik pada *Escherichia coli* pada ikan yang terdapat pada Sungai Batang Arau, diharap menjadi rujukan oleh pemerintah setempat dalam mengambil kebijakan mengenai penggunaan antibiotik yang tepat dan sebagai peringatan untuk masyarakat yang berada disekitar perairan ini agar hidup lebih bersih serta menjaga lingkungan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Sebagai Indikator Pencemaran

2.1.1 Ikan sebagai indikator pencemaran dan sumber bakteri patogen

Penggunaan sampel digunakan dalam penelitian ini adalah ikan yang berada di Sungai Batang Arau. Selain sebagai bahan makanan yang terkontaminasi oleh limbah-limbah industri, rumah tangga dan limbah rumah sakit, ikan dapat juga menjadi indikator pencemaran. Ikan dapat menunjukkan reaksi terhadap perubahan fisik air maupun terhadap adanya senyawa pencemar yang terlarut dalam batas konsentrasi.¹

Rumah Sakit M. Jamil dan Rumah Sakit BMC yang terletak pada 1 jalur aliran badan air yang sama yang mengalir ke Sungai Batang Arau. Penanganan limbah rumah sakit di Padang belum optimal, salah satunya Rumah Sakit M. Jamil⁹. Selain itu Pencemaran juga terjadi akibat adanya aktifitas perindustrian di hulu Sungai Batang Arau yang telah mempengaruhi aspek fisika kimia air dan fisiologis ikan yang ditemukan di aliran sungai tersebut. Secara umum kualitas air padang perairan ini mengalami penurunan dimana sudah tidak dapat digunakan untuk air minum namun masih memungkinkan dapat digunakan untuk perikanan atau budaya perikanan.¹⁰

2.1.2 Ikan Balang (*Pristolepis fasciata* Blkr)

Ikan Balang (Padang), Ikan Kepor (Riau), yang terdapat di Sungai Batang Arau tidak berasal dari kolam budidaya penduduk. Ikan ini merupakan ikan yang umum tersebar di perairan sungai Sumatera Barat. Jenis Ikan Balang ini juga ditemukan diperairan Sungai Batang Anai Pariaman. Karakteristik morfologinya antara lain: Badan pipih, mulut kecil, warna coklat kurang lebih terdapat 10 pita warna kehitaman melintang di badannya. Bagian punggung terdapat sirip punggung yang tajam dan keras, berfungsi sebagai pelindung diri. Ikan balang rata-rata mempunyai ukuran panjang total antara 4-15 cm dan bobot tubuh antara 5-65 g. Berdasarkan kebiasaan makannya ikan balang merupakan jenis ikan pemakan segala (omnivora), tetapi ikan ini cenderung bersifat karnivora karena lebih menyukai makanan berupa ikan dan udang kecil.^{10,11}

Taksonomi *Pristolepis fasciata*:

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Chordata</i>
Kelas	: <i>Actinopterygii</i>
Orde	: <i>Perciformes</i>
Famili	: <i>Nandidae</i>
Genus	: <i>Pristolepis</i>
Spesies	: <i>Pristolepis fasciata</i>



Gambar 1. Ikan Balang *Pristolepis fasciata*

2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri patogen yang menyebabkan penyakit. Ciri-ciri bakteri patogen yaitu kemampuan untuk menularkan, melekat pada sel inang, menginvasi sel inang dan jaringan, mampu untuk meracuni dan mampu untuk menghindari dari sistem kekebalan inang. Manusia dan binatang memiliki flora normal yang melimpah dalam tubuhnya yang biasanya tidak menyebabkan penyakit tetapi mencapai kesetimbangan yang menjamin bakteri dan inang untuk tetap bertahan, tumbuh dan berpropagasi. Beberapa bakteri penting yang menyebabkan penyakit pada pembenihan tumbuh bersama dengan flora normal. Contohnya *Escherichia coli* adalah bagian flora normal gastrointestinal manusia tapi juga merupakan penyebab umum infeksi urin, diare pada musafir dan penyakit lain. Ada beberapa bakteri yang sudah jelas patogen, tapi infeksi tetap belum kelihatan.

Bakteri dan mikroorganisme lain menyesuaikan diri dengan lingkungan, termasuk manusia dan binatang meningkatkan kemampuannya untuk bertahan dan meningkatkan kemungkinan penyebaran. Salah bentuk penyebaran pada *E.coli* yang

menyebabkan diare adalah kontaminasi produk makanan oleh sampah yang mengandung *E.coli* tersebut.¹²

2.2.1. Morfologi dan Taksonomi *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri batang gram negatif, terdapat tunggal, berpasangan dan dalam rantai pendek. Biasanya *Escherichia coli* tidak berkapsul, tidak berspora dan ada yang aerobik ataupun anaerobik fakultatif.

Taksonomi *Escherichia coli* sebagai berikut:

Divisi :Protophyta

Kelas :Schizomycetes

Ordo :Eubacteriales

Famili :Enterobacteriaceae

Genus :Escherichia

Spesies :*Escherichia coli*

Walapun *Escherichia coli* merupakan bagian mikrobiota normal saluran pencernaan, kini terbukti bahwa galur-galur tertentu mampu menyebabkan gastroenteritis taraf sedang sampai parah pada manusia dan hewan.

Escherichia coli yang menyebabkan diare akut dapat dikelompokkan menjadi tiga kategori, yaitu:

1). *E.coli* enteropatogenik (EPEC)

E.coli enteropatogenik menyebabkan gastroenteritis akut pada bayi yang baru lahir sampai pada berumur 2 tahun. Penentuan serotipe yang terinci dalam hubungannya dengan penyelidikan epidemiologis menunjukkan bahwa sekitar 17 serotipe O telah diimplikasikan dengan enteritis pada bayi di banyak negara. Serogrup yang paling umum adalah 026, 055, 086, 0111, 0114, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128 dan 0142.

2). *E.coli* Enteroinvasif (EIEC)

Serotipe-serotipe *E.coli* tertentu selain yang enteropatogenik di temukan sebagai penyebab diare pada anak-anak yang lebih besar dan pada orang dewasa. Serotipe-serotipe tersebut adalah 0124, 0136 dan 0144. Mereka ini menyerang sel-sel epitel usus besar dan menyebabkan sindrom klinis yang mirip dengan sindrom yang disebabkan oleh *Shigella*.

3). *E.coli* Enterotoksigenik (ETEC)

Galur-galur *E.coli* yang enteroksigenik, atau yang menghasilkan enterotoksin, paling sering adalah serotipe, 06, 08, 0225, 078, 0148 dan 0159. Mereka ini menghasilkan salah satu atau dua macam toksin yang berbeda. Tahan panas (TP) dan tidak tahan panas (TTP).

4) *E.coli* Enterohaemorrhagic (EHEC)

EHEC banyak dihubungkan dengan diare parah dan penyakit akibat kegagalan ginjal akut dan *thrombocytopenia*. Serotipe yang memproduksi toksin ini adalah O157:H7. Komplikasi dari penyakit ini dapat dicegah dengan cara memasak daging segar.

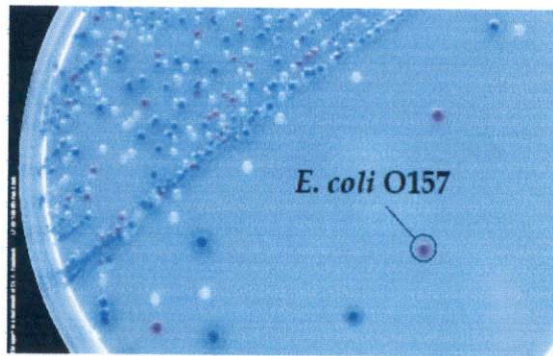
5) *E.coli* Enteroagregative (EAEC)

EAEC menyebabkan diare yang akut dan kronis (dalam jangka waktu >14 hari) pada orang di negara berkembang. Organisme ini juga menyebabkan penyakit karena makanan dinegara industri. Akibat dari infeksi ini adalah kerusakan mukosa, pengeluaran sejumlah besar mucus, terjadinya diare.¹²

2.2.2 *Escherihia coli* O157:H7

E. coli O157:H7 termasuk kelompok enterohaemorrhagic *E. coli* yang dapat menghasilkan shiga toksin *stx*₁ dan *stx*₂, yang dapat menyebabkan terjadinya enterohaemorrhagic colitis dan haemolytic uremic syndrome (HUS). Haemorrhagic colitis memiliki gejala diare berdarah, kram perut, gagal ginjal, dan menyebabkan kematian mikroflora dalam usus. Bila haemorrhagic colitis dibiarkan, penyakit ini dapat berakibat fatal karena adanya komplikasi yang disebabkan oleh haemolytic uraemic syndrome yang dapat menyebabkan kerusakan sel darah merah, dan gagal ginjal, serta diare dengan feses yang mengeluarkan darah.^{13,14}

Bakteri ini umumnya tinggal di usus hewan, khususnya sapi, tanpa menimbulkan gejala penyakit. Bakteri ini juga dapat diisolasi dari feses ayam, kambing, domba, babi, anjing, dan kucing⁴. Kebanyakan Infeksi *E. Coli* O157:H7 telah dikaitkan dengan makanan yang kurang masak, air minum, sayur-sayuran, daging yang terkontaminasi, susu yang tidak dimasak, dan terminum air kolam renang.¹⁵



Gambar 2. *E. coli O157:H7* pada medium CHROMagar™ O157

2.2.3. Karakteristik *E. coli O157:H7*

E. coli O157:H7 juga memiliki ciri-ciri kondisi lingkungan yang berbeda dengan *E. coli* lainnya, dimana ia dapat bertahan hidup pada kondisi suhu yang rendah dan dalam kondisi asam. Hal ini tidak terjadi pada *E. coli* lain yang tidak dapat bertahan hidup pada kondisi suhu rendah dan dalam kondisi pH asam.¹⁶

2.2.4. Serotipe *E. coli O157:H7*

Lebih dari 50 serotipe dari *E. coli* dikaitkan dengan *hemorrhagic colitis* dan *Haemolytic uremic syndrome* pada manusia. Pemberian serotipe bakteri *E. coli O157:H7* berdasarkan perbedaan antigen dari struktur permukaan bakteri. Huruf awal serotype (O dan H) berdasarkan antigen somatic (O) dan antigen flagelar (H).

Antigen O merupakan bagian terluar dinding sel lipopolisakarida dan terdiri dari unit berulang polisakarida. Antigen O tahan terhadap panas dan alkohol. Antigen H terletak pada flagella, dapat didenaturasi atau dapat dihilangkan oleh panas atau alkohol.¹²

2.2.5. Epidemiologi dan Kasus *E. coli O157:H7*

Akhir-akhir ini yang menjadi perhatian adalah meningkatnya wabah yang disebabkan oleh *enterohemorrhagic E. coli* (EHEC) dan berkaitan dengan konsumsi daging, buah, sayuran yang tercemar, khususnya di negara berkembang. Pangan asal hewan yang sering terkait dengan wabah EHEC di Amerika Serikat, Eropa, dan Kanada adalah daging sapi giling (*ground beef*). Serotipe utama yang berkaitan dengan EHEC adalah *E. coli O157:H7*, yang pertama kali dilaporkan sebagai penyebab wabah *foodborne disease* (diare berdarah) pada tahun 1982-1983, yang disebabkan oleh konsumsi hamburger.

Selanjutnya, infeksi tersebut muncul dengan cepat sebagai penyebab utama penyakit diare berdarah dan gagal ginjal akut yang dapat menyebabkan kematian pada anak-anak serta lansia, dengan masa inkubasi antara 2-8 hari dan gejala akan muncul setelah 3-4 hari setelah infeksi. Infeksi ini pernah dilaporkan dari Australia, Kanada, Jepang, Amerika Serikat, dan banyak negara Eropa. Pada tahun 1993, KLB besar infeksi *E. coli* O157:H7 menyerang sekitar 500 penduduk di beberapa negara bagian AS yang terletak di barat laut. Banyak anak yang terjangkit infeksi tersebut mengalami HUS dan empat orang di antaranya meninggal dunia akibat sindrom ini. Pada tahun 1996, Kejadian Luar Biasa terbesar infeksi *E. coli* O157:H7 pernah tercatat terjadi di Jepang yaitu menjangkiti 6.309 anak sekolah serta 92 anggota staf sekolah. Infeksi ini menyebabkan dua kasus kematian. Investigasi epidemiologi menemukan lobak muda sebagai kemungkinan penyebab Kejadian Luar Biasa tersebut. Kejadian Luar Biasa lain *E. coli* O157 yang penting terjadi di Skotlandia sejak November 1996 sampai Januari 1997. Kurang lebih 400 penduduk terjangkit infeksi ini dan sekitar 20 lansia meninggal dunia sebagai akibatnya. Setelah ditelusuri, infeksi tersebut ternyata berasal dari daging beku yang dimasak (potongan daging biasa atau daging dalam *sandwich*) dan dibeli dari rumah potong hewan setempat.¹⁷

Di Indonesia, KLB yang disebabkan oleh *STEC* atau *E. coli* O157:H7 belum diketahui secara pasti meskipun pada tahun 2008, seorang peneliti di Yogyakarta melaporkan ditemukannya *E. coli* O157:H7 4,3% (3 dari 70 isolat) dari pasien yang menderita diare di Yogyakarta.¹⁸

Beberapa penelitian telah dilakukan di kota Padang, Sumatera Barat. Pada tahun 2009, A. Aziz Djamil telah menemukan bakteri *Escherichia coli* O157 pada 30% sampel makanan dan makanan olahan. Semua sampel yang diperoleh di Danau Singkarak dan beberapa pasar di sekitar Padang Deteksi gen yang dilakukan terhadap kultur murni *E. coli* O157:H7 dari sampel dihasilkan data, 50 kultur *E. coli* O157:H7 dari sampel *Faunus ater* mentah, 37 kultur positif mempunyai gen *stx*₁ dan 9 kultur positif mempunyai gen *stx*₂. Dari 50 kultur *E. coli* O157:H7 dari sampel *Corbicula molktiana* mentah, 3 kultur positif mempunyai gen *stx*₁ dan 20 kultur positif mempunyai gen *stx*₂ dan 20 kultur mempunyai gen *stx*₁ dan *stx*₂. Dari 60 kultur *E. coli* O157:H7 dari sampel *Batissa violaceae* mentah, 40 kultur positif mempunyai gen *stx*₁ dan 44 kultur positif mempunyai gen *stx*₂. Dari 40 kultur *E. coli* O157:H7 sampel

daging sapi mentah, 22 kultur positif mempunyai gen *stx*₁ dan 22 kultur positif mempunyai gen *stx*₂. Dari 28 kultur *E.coli* O157:H7 sampel daging ayam mentah, 22 kultur positif mempunyai gen *stx*₁ dan 15 kultur positif mempunyai gen *stx*₂. Dari 32 kultur *E.coli* O157:H7 dari sampel daging ayam olahan, 22 kultur positif mempunyai gen *stx*₁ dan 9 kultur positif mempunyai gen *stx*₂. Dari 20 kultur *E.coli* O157:H7 dari sate daging sapi olahan, 15 kultur positif *stx*₁ dan 15 kultur positif mempunyai gen *stx*₂. Dari 50 kultur *E.coli* O157:H7 dari *Corbicula molktiana* olahan, 37 kultur positif *stx*₁ dan 23 kultur positif mempunyai gen *stx*₂, dari 50 kultur *E.coli* O157:H7 dari *Faunus ater* olahan, 23 kultur positif mempunyai gen *stx*₁ dan 9 kultur positif mempunyai gen *stx*₂. 50 kultur *E.coli* O157:H7 dari *Batissa violacae*, 26 kultur positif mempunyai *stx*₁ dan 3 kultur positif mempunyai gen *stx*₂.¹⁹

Pada penelitian sebelumnya diperoleh hasil pada sate ayam 32 kultur, di uji 68% yang positif *stx*₁ dan 28% positif *stx*₂. Pada sampel sate daging 20 kultur, diperoleh 75% positif *stx*₁ dan 75% positif *stx*₂. Kemungkinan hal ini disebabkan oleh pembakaran sate yang tidak sempurna sehingga menyebabkan bakteri patogen tersebut tidak mati. Sampel lokan 60 kultur, diperoleh 66,67% positif *stx*₁ dan 73,33% positif *stx*₂.²⁰ Sampel langkitang 50 kultur, diperoleh 74% positif *stx*₁ dan 9% positif *stx*₂. Sedangkan pada sampel pensi 50 kultur, diperoleh 64% positif *stx*₁ dengan 20 kultur diantaranya juga positif memiliki gen *stx*₂.²¹ Hal ini disebabkan lokan, langkitang dan pensi memiliki cangkang yang keras dan kuat sehingga memungkinkan bakteri ini bersembunyi dan hidup dalam serta tidak mati dalam proses pemasakan.

2.2. Virulensi dan Patogenitas gen *eae*, *stx*₁, *stx*₂

Gen *stx*₁, *stx*₂ dan *eae* mendeteksi bakteri *E. coli* O157:H7. Bakteri *E. coli* O157:H7 masuk melalui makanan kemudian menempel pada usus serta membentuk koloni menghasilkan *shiga like toxin*. Toksin ini bekerja dengan cara menghambat sintesa protein dengan inaktivasi subunit ribosom 60s dari sel sehingga menghambat translasi mRNA yang menyebabkan kematian sel. Shiga like toxin terdiri dari dua subtype yaitu *stx*₁ dan *stx*₂. Selain memiliki struktur sub unit-a dan subunit-b yang sama, kedua subtype toksin tersebut juga mempunyai aktivitas toksin yang sama. Gen *stx*₂ mempunyai sifat toksisitas yang lebih kuat.

Toksin yang dihasilkan oleh *E. coli* O157:H7 dalam lumen usus manusia dapat masuk ke lapisan usus bagian lebih dalam, akibat adanya faktor virulen lain yaitu : intimin, yang akan menyebabkan *E. coli* O157:H7 lekat pada mukosa dan epitel usus dengan cara *Attachment-effacement*, artinya koloni menempel dan sebagian badan masuk menghilang dalam sel inang. Setelah masuk dan membuat luka pada sel, koloni akan memproduksi protein *Shiga-like toksin* sebagai hasil ekspresi gen virulen *stx*₁ dan *stx*₂. Toksin berikatan dengan reseptor spesifik pada sel target epithelial usus dan akhirnya masuk ke sistemik.²²

Toksin ini dapat menyebabkan *haemorrhagic colitis* dan HUS. *Haemorrhagic colitis* terjadi jika toksin ini menginfeksi usus besar dan menyebabkan pecahnya pembuluh darah pada usus besar. Gejala yang timbul pada *haemorrhagic colitis* dimulai dengan kram perut akut dan diikuti dengan diare cair. Setelah 24 jam diare cair akan berubah menjadi diare berdarah. Suhu tubuh pasien biasanya normal dan diare berdarah akan berlangsung selama 1-8 hari. Kira-kira 5% dari kasus *hemorrhagic colitis* akan berkembang menjadi HUS.¹⁴

2.3 Antibiotik

Antibiotik ialah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba, terutama fungi, yang dapat menghambat atau dapat membasmi mikroba jenis lain.²³

2.3.1 Mekanisme kerja antibiotik¹²

Mekanisme kerja dari antibiotik terbagi atas 5, yaitu:

- 1) Antibakteri yang menghambat metabolisme sel bakteri

Bakteri memerlukan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Asam folat ini disintesis dari asam para aminobenzoat (PABA) dalam sel bakteri. Antibakteri golongan ini bekerja dengan membentuk analog asam folat nonfungsional, sehingga kehidupan bakteri akan terganggu, maka diperoleh efek bakteriostatik. Contoh antibakteri golongan ini adalah sulfonamida, trimetoprim, dan asam p-aminosalisilat.

- 2) Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel bakteri

Antibakteri golongan ini bekerja dengan menghambat proses transpeptidasi rantai peptidoglikan. Tekanan osmotik didalam sel bakteri lebih tinggi dibanding diluar sel, kerusakan dinding sel bakteri mengakibatkan terjadinya

lisis, maka diperoleh efek bakterisida. Contoh antibakteri golongan ini, antara lain basitrasin, vankomisin, dan sefalosporin.

3) Antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel bakteri.

Antibakteri golongan ini bekerja dengan merusak sel bakteri setelah bereaksi dengan gugus fosfat pada fosfolipid membran sel bakteri, contohnya polimiksin. Antibakteri golongan ini dapat pula berikatan dengan struktur sterol yang terdapat pada membran sel sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran sel tersebut, contohnya adalah antibakteri polien.

4) Antibakteri yang menghambat sintesis protein sel bakteri.

Bakteri perlu mensintesis berbagai protein yang berlangsung didalam ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya. Ribosom bakteri terdiri dari dua unit yaitu ribosom 30s dan 50s. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen tersebut harus bersatu pada pangkal rantai mRNA membentuk ribosom 70s. Antibakteri golongan ini bekerja dengan mengganggu ikatan kedua komponen tersebut, sehingga tRNA dalam membaca kode mRNA pada proses sintesis protein, akibatnya terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel bakteri. Contoh antibakteri golongan ini adalah golongan aminoglikosida, makrolida, dan linkomisin.

5) Antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri.

Antibakteri golongan ini dapat berikatan dengan enzim polimerase-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut, contohnya adalah rifampisin. Cara kerja yang lain adalah dengan menghambat enzim DNA girase pada bakteri yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga dapat masuk ke dalam sel bakteri tersebut, contohnya adalah antibakteri golongan kuinolon.

2.3.2 Antibiotik untuk penanganan diare²⁴

1) *Amoxicilin* dan *ampicilin*

Kedua antibiotik ini merupakan turunan penisilin. Antibiotik ini merusak lapisan peptidoglikan yang menyusun dinding sel bakteri Gram positif maupun Gram negatif. Penisilin memiliki struktur yang mengandung inti berupa cincin laktam. Perbedaan molekul antar turunan penisilin berada pada rantai samping kimia yang melekat pada intinya. Mekanisme kerjanya adalah mencegah ikatan silang peptidoglikan pada tahap terakhir sintesis

dinding sel yaitu dengan cara menghambat protein pengikat penisilin. Protein ini merupakan enzim dalam membran plasma sel bakteri yang secara normal terlibat dalam penambahan asam amino yang berikatan silang dengan peptidoglikan dinding sel bakteri dan memblokir aktifitas enzim transpeptidase yang membungkus ikatan silang polimer-polimer gula panjang yang membentuk dinding sel bakteri sehingga dinding sel menjadi rapuh dan mudah lisis.

2) *Tetracycline*

Tetracyclin merupakan antibiotik yang memiliki mekanisme penghambatan pada sintesis protein. Antibiotik ini berspektrum luas dan diproduksi oleh *Streptomyces spp.* *Tetracyclin* dinamakan sesuai 4 cincin hidrokarbon yang dimilikinya. *Tetracycline* berperan menghambat sintesis protein bakteri dengan cara berikatan pada bagian 16S ribosom subunit 30S, sehingga mencegah aminoasil-tRNA terikat pada situs A (situs aktif) pada ribosom. Ikatan ini secara alami bersifat reversible.

3) *Chloramphenicol*

Chloramphenicol merupakan antibiotik dengan struktur sederhana sehingga mudah dibuat secara sintetik dibandingkan dengan mengisolasinya dengan *Streptomyces*. Ukurannya relatif kecil sehingga mudah berdifusi ke dalam tubuh. Antibiotik ini memberikan efek dengan cara bereaksi pada sub unit 50S ribosom dan menghalangi aktifitas enzim peptidil transferase. Enzim ini berfungsi untuk membentuk ikatan peptide antara asam amino baru yang masih melekat pada tRNA dengan asam amino terakhir yang sedang berkembang. Sebagai akibatnya, sintesis protein bakteri akan terhenti seketika.

2.3.3 Resistansi antibiotik

Resistensi bakteri terhadap antibakteri ialah suatu sifat tidak terganggunya kehidupan sel bakteri pada pemberian antibakteri. Sifat ini dapat merupakan suatu mekanisme alamiah untuk bertahan hidup²⁴. Resistensi bakteri umumnya terjadi di daerah dengan tingkat penggunaan antibakteri yang cukup tinggi, contohnya pada suatu rumah sakit. Pengawasan sifat resistensi bakteri terhadap antibakteri dapat menjadi petunjuk dalam memilih antibakteri yang tepat pada terapi penyakit.

Mekanisme terjadinya resistensi pada bakteri terhadap suatu antibakteri adalah sebagai berikut ¹²:

- 1) Bakteri menghasilkan enzim yang merusak obat aktif, seperti *S. aureus* yang menghasilkan β -laktamase untuk mendegradasi penicillin G.
- 2) Bakteri merubah permeabilitasnya terhadap antibakteri, seperti *Streptococcus* yang memiliki penghalang permeabilitas terhadap antibakteri aminoglikosida.
- 3) Bakteri mengembangkan sasaran struktur yang diubah terhadap antibakteri, seperti resistensi kromosom terhadap aminoglikosida yang dihubungkan dengan hilang atau berubahnya suatu protein khusus pada subunit 30S dari ribosom pada bakteri yang merupakan tempat pengikat pada yang sensitif.
- 4) Bakteri mengembangkan jalur metabolisme lain yang memintas reaksi yang dihambat oleh antibakteri, seperti pada beberapa bakteri yang resisten terhadap sulfonamida dengan memanfaatkan asam folat yang telah terbentuk, sehingga tidak tergantung pada PABA ekstrasel.
- 5) Bakteri membentuk suatu enzim yang telah mengalami perubahan, tetapi enzim tersebut masih dapat menjalankan metabolismenya, serta tidak begitu dipengaruhi oleh antibakteri seperti pada bakteri yang sensitif. Contohnya pada bakteri yang resisten terhadap trimetoprim, reduktase asam dihidrofolat menghambat efisiensi lebih kurang daripada bakteri yang sensitif terhadap trimetoprim.

Asal usul resistensi bakteri terhadap antibakteri dikelompokkan menjadi dua, yaitu ¹¹:

- 1) Genetik

Resistensi ini terjadi akibat mutasi spontan pada lokus yang mengendalikan sensitivitas terhadap antibakteri yang diberikan (resistensi kromosom) ataupun pemindahan unsur-unsur genetik (resistensi ekstrakromosom) melalui transduksi, transformasi, konjugasi, dan translokasi.

- 2) Nongenetik.

Replikasi aktif dari bakteri diperlukan untuk daya kerja sebagian besar antibakteri. Oleh karena itu, bakteri yang metabolismenya tidak aktif (tidak berkembang biak) secara fenotipik resisten terhadap antibakteri. Namun, turunannya sensitif.

Bakteri yang resisten terhadap antibakteri tertentu dapat juga resisten terhadap antibakteri lain yang memiliki mekanisme kerja yang sama. Hal ini disebut dengan resistensi silang.

2.3.4 Kategori Hasil tes sensitifitas antimikroba

Terdapat 3 jenis kategori hasil tes sensitifitas antimikroba, yaitu :

a. Sensitif (susceptible)

Merupakan Kategori hasil tes sensitifitas antimikroba yang menunjukkan bahwa antimikroba dapat menjadi pilihan tepat untuk tatalaksana infeksi yang disebabkan oleh isolat bakteri yang diperiksa.

b. Intermediet

Merupakan kategori tes sensitifitas antimikroba yang menunjukkan bahwa antimikroba masih ada kemungkinan efektif terhadap isolat yang diperiksa tetapi mungkin lemah dalam menghadapi isolat yang sensitif

c. Resisten (Resistant)

Merupakan kategori hasil tes sensitifitas antimikroba yang menunjukkan antimikroba bukan pilihan yang tepat untuk tata laksana infeksi yang disebabkan oleh isolat bakteri yang diperiksa, dapat disebabkan oleh organisme tidak dapat dihambat dengan kadar obat yang dapat diterima atau karena hasil pemeriksaan berhubungan dengan mekanisme resistansi yang membuat keberhasilan terapi diragukan.

2.3.5 Kejadian Resistansi Antibiotik

Penggunaan antibiotik yang tidak sesuai di dunia sudah dalam tahap yang mengkhawatirkan, WHO sebagai lembaga yang bertanggung jawab dibidang kesehatan telah mengeluarkan aturan dalam penggunaan antibiotik.

Escherichia coli Resistansi antibiotik

Penelitian mengenai *Escherichia coli* yang resisten terhadap antibiotik menjadi perhatian, terutama dinegara berkembang, karena hubungan bakteri ini dengan makanan yang dikonsumsi manusia. Beberapa penelitian telah melakukan uji resistansi bakteri *Escherichia coli* dari berbagai sumber makanan.

Penelitian yang dilakukan oleh Kumar pada tahun 2005 di India, didapatkan 116 strain *E.coli* dan diuji resistansinya dengan 14 antibiotik yang berbeda-beda. 7 strain resistan terhadap lebih dari lima antibiotik yang mana salah satunya resistan

terhadap 8 antibiotik. Persen antibiotik terbesar adalah *Vancomycin* yaitu 94%, *Cephalothin* 67.2%, *Penicillin G* 42%, *Ampicillin* 4.3%, *Amoxycillin* 2.5% dan *Kanamycin* 2.5%. Penelitian ini dilakukan di India yang merupakan negara berkembang, sama seperti Indonesia dengan tingkat populasi yang besar. Sampel berupa ikan, udang dan kerang diambil dari pasar dan tambak ikan yang bertempat pada muara sungai.⁷

Selain pada ikan segar, Kumar pada tahun 2008 juga meneliti ikan asin kering dari pasar ikan Tuticorin. Ikan asin kering yang digunakan adalah *Sardinella gibbosa*, *Terapon theraps*, *Terapon sp.*, *S.longiceps*, *Sphyraena sp.*, *Sardinella fimbriata*, *Upeneus sp.*, *Thryssa setirostris*, *Lutjanus vitta*, *Sillago sihama*, *Gerres filamentosus*, *Stolephorus japonicus*, *Lethrinus sp.*, *Sardinella albella* dan *Mugil cephalus*. Berdasarkan penelitiannya, ikan ini terkontaminasi jamur dan bakteri patogen seperti *E.coli*. bakteri ini juga diuji resistansi dengan beberapa antibiotik yaitu *Vancomycin*, *Bacitracin*, *Penicillin G*, *Neomycin*, *Streptomycin* dan *Chloramphenicol*. Hasilnya semua strain bakteri *E.coli* resistan terhadap antibiotik *Vancomycin*, *Bacitracin* dan *Penicillin G*. Sedangkan antibiotik *Neomycin*, *Streptomycin* dan *Chloramphenicol* sensitif terhadap bakteri patogen ini.²⁷

Selain makanan laut, bahan makanan dari daging unggas juga telah diteliti resistansi antibiotik dari bakteri *Echerichia coli* yang didapatkan. Penelitian ini dilaksanakan oleh Muhammad Ali Akond di Bangladesh pada tahun 2009. Daging unggas yang didapatkan dari peternakan menggunakan antibiotik. Didapatkan hasil bahwa 145 sampel (58%) dari total 250 sampel ditemukan positif *E.coli* dan resistan terhadap *Penicillin*, *Ciprofloxacin*, *Riphampicin*, *Kanamycin*, *Streptomycin*, *Cefixine*, *Erythromycin*, *Ampicillin*, *Tetracycline* dan 20% strain menunjukkan resistan terhadap dua antibiotik *Chloramphenicol* dan *Neomycin*. Tidak ada strain yang menunjukkan resistansi untuk antibiotik *Norfloxacin* dan *Gentamicin*. Strain yang sensitif didapatkan 60-86% untuk *Norfloxacin*, *Gentamicin*, *Chloramphenicol* dan *Neomycin* dan 26-36% strain melawan *Tetracycline*, *Streptomycin* dan *Ampicilin*. Multi resistan ditemukan sebanyak 6-10 antibiotik untuk seluruh strain yang digunakan. Dari penelitian-penelitian ini memiliki masalah pada lingkungan yang menyebabkan terkontaminasinya bahan makanan dengan bakteri patogen. Sehingga perlu diperhatikan efisiensi antibiotik yang digunakan untuk menangani penyakit akibat bakteri patogen ini. Selain itu peneliti ini juga menduga adanya kontaminasi dari

limbah-limbah yang mencemari habitat dari sumber makanan ini, seperti limbah rumah sakit, limbah peternakan dan limbah pertanian.²⁸

2.4.Elektroforesa Gel

Teknik elektroforesis merupakan salah satu teknik pemisahan molekul dengan menggunakan arus listrik yang memanfaatkan prinsip perbedaan berat/besar molekul. Teknik tersebut dapat diterapkan untuk molekul-molekul seperti DNA, RNA, atau protein dapat dipisahkan oleh medan listrik. Dalam hal ini, molekul-molekul tersebut dipisahkan berdasarkan laju perpindahannya oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel²⁶. Disamping berdasarkan berat atau besar molekulnya, teknik elektroforesis juga dapat digunakan untuk memisahkan molekul-molekul yang didasarkan kepada jenis muatan listrik dan titik isoelektriknya.²⁹

Senyawa agarosa merupakan bahan yang sering dan banyak digunakan dalam teknik elektroforesis. Bahan ini merupakan senyawa disakarida dari D-Galactose dan 3,6 anhydro-L-Galactose dengan kandungan senyawa sulfat yang rendah. Senyawa agarose diisolasi dari rumput laut yang untuk pertama kalinya diisolasi dari Jepang. Penggunaannya sebagai bahan matriks untuk pemisahan secara electrophoresis baru dilakukan pada tahun 1973.²⁹

Dibanding poliakrilamid gel, gel agarose mempunyai keuntungan yaitu: mempunyai laju pemisahan lebih cepat, dapat memisahkan fragmen DNA antara 100bp – 50kb tergantung dari konsentrasi gel agarose yang digunakan medan gerak biasanya horizontal.³⁰

Dalam proses elektroforesis, sampel molekul ditempatkan ke dalam sumur (*well*) pada gel yang ditempatkan di dalam larutan penyangga, dan listrik dialirkan kepadanya. Molekul-molekul sampel tersebut akan bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai dengan muatannya. Dalam hal ini asam nukleat memiliki arah pergerakan menuju elektroda positif, disebabkan oleh muatan negatif alami pada rangka gula-fosfat yang dimilikinya. Selama *running* DNA dengan elektroforesis, diperlukan larutan buffer. Larutan untuk gel agarosa umum adalah senyawa 1xTBE buffer yang terdiri dari Tris, Boric Acid, dan EDTA.²⁹

Pada pembuatan agarose, ditetaskan etidium bromide yang bertujuan untuk pewarnaan (*staining*) sehingga molekul sampel yang telah terpisah akan berpendar dalam sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 260 nm. Etidium bromide akan

membentuk senyawa interkalar antara molekul untai ganda DNA sehingga dapat berflouresensi dibawah sinar UV, maka pita-pita DNA dapat dilihat dibawah alat penngamat DNA dan dapat difoto.

2.5. Polimerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi Polimerase Berantai atau dikenal sebagai PCR, merupakan suatu proses sintesis enzimatik untuk mengamplifikasi nukleotida secara *in vitro*. Metoda PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula, sekitar 10^6 - 10^7 kali. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap siklus PCR akan diperoleh 2^n kali banyaknya DNA target, sehingga akan tercipta kopi dari area target cetakan DNA sebanyak satu milyar. Produk PCR ini, yang terkadang disebut sebagai 'amplicon', dalam jumlah yang cukup dapat diukur dengan mudah menggunakan elektroforesis gel.²⁹

PCR ditemukan pertama kali oleh Karry Mullis pada tahun 1983. Atas penemuannya ini ia dianugrahi penghargaan Nobel dan Japan Prize pada tahun 1993. Metoda PCR ini telah banyak dikembangkan dan telah digunakan dalam berbagai bidang sampai sekarang ini. Metoda ini digunakan dalam berbagai bidang antara lain:

1. Mengkloning gen yang telah diketahui proteinnya
2. "Primer" bisa dirancang dari rantai asam amino atau rantai gen. Hasil amplifikasinya dapat digunakan untuk mengetahui rantai panjang suatu gen dari DNA maupun dari genom DNA.
3. Amplifikasi DNA yang sudah lama
Amplifikasi yang dilakukan pada fosil maupun benda-benda museum. Dapat digunakan para arkeolog untuk mengetahui atau menelusuri sejarah maupun evolusi yang terjadi.
3. Mendeteksi infeksi yang disebabkan oleh virus maupun bakteri
Teknologi saat ini memungkinkan diagnosa dalam hitungan jam dengan hasil akurat. Disebut akurat karena PCR mengamplifikasi daerah tertentu DNA yang merupakan ciri khas virus atau bakteri yang tidak dimiliki oleh virus atau bakteri lainnya.
4. Diagnosa penyakit secara genetik :
 - a. Diagnosa penyakit turunan, seperti diabetes melitus, hemofili A dan B

- b. Diagnosa dan memonitor terapi kanker
 - c. Penentuan golongan darah
 - d. Diagnosa pada fetus, seperti penentuan jenis kelamin, kecenderungan adanya penyakit turunan.
5. Penggunaan di bidang forensik
- Di bidang forensik bisa digunakan untuk menemukan pelaku suatu kejahatan. DNA yang diambil bisa dari darah yang ada pada baju korban atau bagian lain seperti rambut.

2.5.1. Komponen Dasar PCR ²⁹

Proses PCR membutuhkan 5 komponen dasar yaitu :

1. Molekul DNA/*Template* DNA

Yaitu DNA *template* (DNA yang akan diamplifikasi) atau DNA target. Kemurnian target DNA sangat penting, karena ketidakmurnian suspensi DNA dapat mempengaruhi reaksi amplifikasi dan dapat menghambat kerja enzim DNA polimerase. Meskipun demikian, pada kondisi tertentu amplifikasi PCR masih dapat bekerja dalam suspensi kasar seperti koloni bakteri. Bakteri tidak perlu diekstraksi dan secara langsung dicampurkan pada komponen PCR sebagai *template*.

2. "Primer"

"Primer" merupakan potongan pendek helaian tunggal DNA spesifik yang pada umumnya akan berukuran 18-25 basa nukleotida. Primer akan berikatan dengan DNA target dan menjadi titik awal dimulainya sintesa DNA baru.

Misalnya pada penentuan gen *eae*, primer yang digunakan yaitu :

Primer 1 : (AE 19) : 5'-CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA-3'

Primer 2 : (AE 20) : 5'-TCAGC0GTGGTTGGATCAACCT-3'

3. Enzim DNA polimerase

Enzim ini bersifat thermostabil dan diisolasi dari *Thermus aquaticus*. Enzim digunakan untuk polimerisasi DNA. Enzim ini tahan sampai temperature mendidih 100°C, dan aktifitas maksimal pada temperatur 92-95°C. Penggunaan enzim ini harus diperhatikan proses penyimpanan (selalu di freezer -20⁰) dan juga pada saat pengambilan tidak boleh terlalu lama di temperatur ruang, usahakan selalu dalam kotak berisi batu es. Hal ini dilakukan untuk meminimalkan

kerusakan enzim yang mungkin terjadi akibat pengaruh perubahan temperature. Taq DNA polimerase yang digunakan dalam PCR adalah milik paten asli dari perusahaan promega.

4. Nukleotida (dNTPS = Deoxynucleotides Triphosphate)

Nukleotida dibutuhkan sebagai suplai untuk mensintesa DNA baru dalam proses perpanjangan DNA. dNTPS terdiri dari dATP, dTTP, dCTP, dGTP.

5. Pereaksi buffer

Buffer standar untuk PCR tersusun atas 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH8.3) dan 1.5 mM MgCl₂. Buffer digunakan untuk mempertahankan pH dan mengkatalis proses enzimatis selama proses PCR. Sedangkan Taq Buffer membantu proses penempelan primer serta mempertahankan kestabilan enzim Taq polimerase.

2.5.2. Siklus kerja PCR ³¹

Secara prinsip, PCR merupakan proses yang diulang-ulang antara 20–40 siklus. Setiap siklus terdiri dari lima tahap :

1. Predenaturasi

Merupakan suatu tahap dimana terjadi pemanasan tutup mesin PCR. Ini dilakukan untuk menghindari terjadinya penguapan selama proses PCR.

2. Denaturasi

Merupakan tahap dimana terjadi pemutusan ikatan rantai ganda DNA menjadi rantai tunggal. Ini terjadi pada suhu tinggi yaitu 94° C, karena untuk memutuskan ikatan hidrogen pada rantai ganda hanya bisa dilakukan pada suhu tinggi. Selain itu proses denaturasi ini juga untuk menghentikan reaksi enzimatis.

3. Annealing

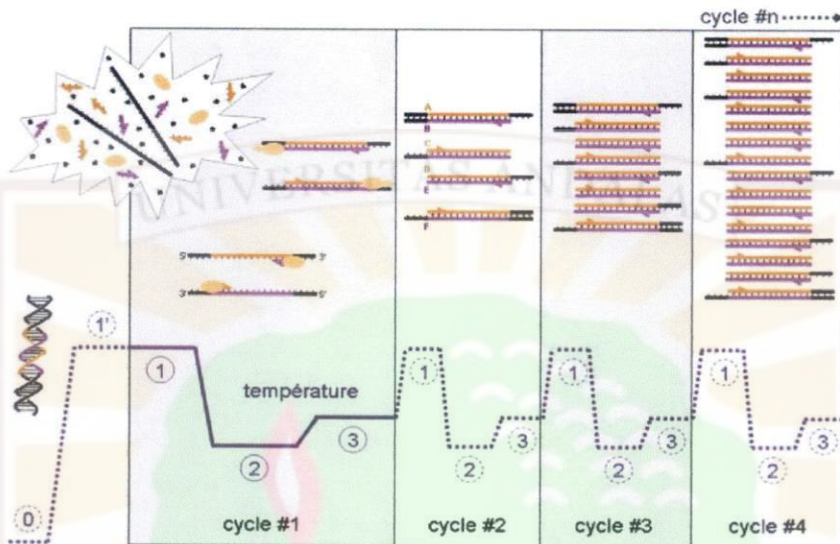
Penurunan temperatur menjadi 50-60⁰C menyebabkan bersatunya kembali ikatan hidrogen antar nukleotida untai tunggal DNA target, tetapi juga membuka kemungkinan menempelnya primer pada masing-masing untai tunggal DNA sel target.

4. Extention/ polimerisasi

Suhu berubah menjadi suhu optimum (72° C) supaya enzim taq polimerase bekerja mengkatalis pemanjangan “primer” dengan penambahan basa-basa polimerisasi). Pengkopian dibaca dari 3’ ke 5’ pada DNA *template* sehingga “primer” bertambah dari 5’ ke 3’.

5. "Elongation"

Merupakan tahap perpanjangan akhir pada proses PCR. Ini bertujuan untuk menyempurnakan perpanjangan rantai DNA sehingga mencapai panjang yang diinginkan sesuai dengan "primer" yang digunakan.



Gambar 3. Skema Amplifikasi DNA dalam PCR

Siklus PCR terjadi berulang-ulang sebanyak yang diperlukan untuk menghasilkan sejumlah hasil amplifikasi yang bisa dideteksi. Biasanya siklus diulang sebanyak 30-40 kali. Kemudian, hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis gel.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia Universitas Andalas, UPTD Laboratorium Kesehatan Depkes Sumatera Barat dan Laboratorium Pemuliaan dan Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas.

3.2 Alat dan bahan

3.2.1 Alat

Magenetic Strirer, Incubator, Incubator Shaker, Autoclave, Lemari Pendingin, Laminar Flow, Pipet Mikro, Ependorf, Elektroforesis, PCR, Gel Documentation, tabung Durham.

3.2.2 Bahan

*Laktose Broth, Brilliant Green lactose Bile Broth (BGLBB), Endo Agar, Tryptone Soy Agar (TSA), Nutrien Agar, Muller Hinton Agar, Luria Bertani Broth, TBE (Tris, Boric Acid, EDTA), Agarose 1%. Ikan Balang, Antibiotic Paper Disc (BBL) (ampicilin, amoxicilin, chloramphenicol, tetracyclin), 1xTE, SDS 10%, Proteinase K, Fenol:Kloroform (1:1), Natrium Asetat, Isopropanol, Etanol 70%, , Ethidium Bromide, Taq polymerase, Primer *stx*₁ F dan *stx*₁ R, Brom Phenol Blue (BPB), dNTP Mix, Taq Buffer, ddH₂O PCR, 1 Kb.*

3.3 Pembuatan medium

3.3.1 Medium *Laktose Broth Single Streght* (LBSS)

Komposisi medium LBSS adalah 5 g laktosa, 3 g *beef extract* dan 5 g Pepton. Semua komponen dicampur dan dilarutkan dalam 1 L akuades. Kemudian distrerilkan dengan autoclave pada suhu 121⁰C tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.2 Medium *Lactose Broth Doule Strenght* (LBDS)

Komposisi medium LBDS adalah 10 g laktosa, 3 g *beef extract* dan 5 g Pepton. Semua komponen dicampur dan dilarutkan dalam 1 L akuades. Kemudian distrerilkan dengan autoclave pada suhu 121⁰C tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.3 Medium Brilliant Green Bile lactose Broth (BGLBB)

Medium BGLBB sebanyak 40 g dilarutkan dalam 1 L akuades. Kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121⁰C tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.4 Medium Endo Agar

Medium Endo agar sebanyak 36 g dilarutkan dalam 1 L akuadest. Kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121⁰C tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.5 Medium Tryptose Soy Agar (TSA)

Medium TSA 40 g dilarutkan dalam 1 L akuades. Kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121⁰C tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.6 Medium Muller Hinton Agar

Medium MH agar sebanyak 38 g dilarutkan dalam 1 L akuades. Kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121⁰C tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.7 Medium Luria Bertani Broth

Komposisi dari medium Luria Bertani ini adalah ekstrak yeast 5 g, NaCl 5 g dan Trypton 10 g. Semua komponen dicampur dan dilarutkan dalam 1 L akuades. Kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121⁰C tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.8 Medium Tryptone Agar

Medium Tryptone Agar sebanyak 26 g dilarutkan dalam 1 L akuades. Kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121⁰C tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.9 Medium Simmon Citrate Agar

Medium *Simmon Citrate Agar* sebanyak 24 g dilarutkan dalam 1 L akuades. Kemudian disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121⁰C tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.4 Pengambilan Sampel

Ikan Balang diambil dari Sungai Batang Arau di daerah pondok (Lampiran 5), karena didaerah ini banyak masyarakat yang memancing dan ada tempat khusus untuk memancing. Sampel diambil sore hari, diletakan dalam plastik selama 15 menit kemudian disimpan dalam lemari pendingin selama 1 malam.

3.5 Isolasi *Escherichia coli* dan Uji Kualitatif Koliform

3.5.1 Uji Kualitatif Koliform (Metoda MPN)

Uji kualitatif koliform yang merupakan uji pendahuluan dalam metoda MPN (Lampiran 1), merupakan salah satu metoda enumerasi bakteri koliform. 10 g sampel ikan dianalisis menggunakan metoda MPN-3 tabung untuk uji kualitatif koliform. Sampel dihomogenkan dengan menggunakan blender steril dengan penambahan akuadest steril 100 mL dan kemudian diinokulasikan ke 13 g LBSS dalam 1 L akuades dan LBDS. Sampel dengan pengenceran 10^{-1} (tabung A) menggunakan LBDS, sedangkan sampel dengan pengenceran 10^{-2} (tabung B) dan 10^{-3} (tabung C) menggunakan LBSS, masing-masing tabung diisi dengan 9 mL mediumnya. Sampel yang ditambahkan juga berbeda pada seri tabungnya, pada tabung A digunakan 10 mL, tabung B digunakan 1 mL dan pada tabung C digunakan 0.1 mL. Medium yang telah ditambahkan sampel dan berisi tabung durham lalu diinkubasi pada 37°C selama 24-48 jam. Tabung LB akan menunjukkan kekeruhan, perubahan pH menjadi asam dan terbentuknya gas pada tabung durham yang membuktikan positif adanya koliform.

3.5.2 Uji Kualitatif Fecal Koliform

Dua loop dari LB yang positif dinokulasikan ke dalam tabung yang berisi 5 mL BGLBB (Lampiran 1). BGLBB akan menunjukkan kekeruhan dan produksi gas selama inkubasi yang menunjukkan positif adanya fecal koliform (*Escherichia coli*), inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 44,5°C pada waterbath.

3.5.3 Isolasi *Escherichia coli*

Untuk isolasi *E.coli*, 2 loop dari tabung BGLBB yang positif digoreskan pada Endo Agar. Koloni berwarna metallik sheen menunjukkan bakteri *Escherichia coli* diambil dari medium tersebut (Lampiran 1).

3.5.4 Pemurnian *Escherichia coli*

Pemurnian *E.coli* dengan TSA dengan konsentrasi 10 g dalam 1 L. TSA dapat juga digunakan untuk deteksi dan enumerasi bakteri *E.coli* dalam air (Lampiran 1).

3.6 Uji Biokimia *Escherichia coli*

Berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacterology* (Lampiran 8) untuk identifikasi bakteri *E.coli* secara biokimia, dilakukan tiga uji, yaitu uji Indol, uji laktosa dan uji sitrat (Lampiran 2)

Uji Indol menggunakan medium tryptone agar. Bakteri diinokulasikan kedalam medium Tryptone Agar kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2x24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya lapisan cincin berwarna merah pada permukaan kultur setelah ditetesi dengan reagen Kovac's.

Uji Laktosa menggunakan medium kaldu laktosa. Bakteri diinokulasikan pada tabung rekasi yang telah berisi medium tersebut dan tabung durham. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Positif *E.coli* ditunjukkan dengan perubahan warna dari merah menjadi kuning.

Uji sitrat menggunakan medium *Simmon Citrate* Agar. Bakteri diinokulasikan ke medium *Simmon Citrate* dengan cara digores. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2x 24 jam. Hasil positif *E.coli* ditandai dengan tidak berubahnya warna medium yang berwarna hijau. Hasil negatif *E.coli* ditandai dengan perubahan warna medium dari hijau menjadi biru tua.

3.7 Uji Resistansi Terhadap Antibiotik

Pada penelitian ini digunakan Media difusi menggunakan kertas disk yang berisi antibiotik dengan konsentrasi tertentu. Pada metode difusi, media yang dipakai adalah agar Mueller Hinton. Suspensi bakteri diuji sensitifitas dengan meratakan suspensi bakteri tersebut pada permukaan media agar dengan metoda tuang. Disk antibiotik diletakkan di atas media tersebut dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 19-24 jam (lampiran 2). Disk antibiotik yang digunakan adalah *Ampicilin*, *Amoxicilin*, *Cloramphenicol* dan *Tetracyclin* dengan konsentrasi tertentu (Tabel 1). Disk antibiotik dengan merek BBL ini memiliki standar yang telah ditentukan (Lampiran 11)

Tabel 1. Daftar Konsentrasi Antibiotik yang Digunakan

No	Nama	Konsentrasi (µg)	Merek
1	<i>Ampicilin</i> (AM)	10	BBL
2	<i>Amoxicilin</i> (AML)	25	BBL
3	<i>Cloramphenicol</i> (C)	30	BBL
4	<i>Tetracyclin</i> (TE)	30	BBL

3.8 Isolasi DNA dan Karakterisasi strain *Escherichia coli*

Karakterisasi strain *Escherichia coli* dan untuk mengetahui adanya gen virulace menggunakan PCR. Primer yang digunakan adalah *stx₁*.⁹ Ekstraksi genom DNA dilakukan dengan metode *Jeff Newman* (Lampiran 3). Isolat *Escherichia coli* dibiakan dalam medium luria Bertani broth selama 16 jam. Kultur media dipindahkan dalam ependorf, kemudian disentrifus 14.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang, pellet kemudian tambahkan dengan 500 µl 1xTE, 50 µL SDS 10%, 5 µL proteinase K, selajutnya diinkubasi selama 1 jam dengan suhu 37°C. Setelah diinkubasi, ditambahkan fenol : kloroform 1:1 sebanyak 600 µL, disentrifus 14000 rpm selama 5 menit. Lapisan supernatan paling atas dipindahkan kedalam ependorf baru, kemudian ditambahkan kembali fenol:kloroform 1:1 sebanyak 600 µL, disentrifus 14000 rpm selama 5 menit. Supernatan paling atas dipindahkan kembali ke ependorf baru. Supernatan tersebut ditambahkan 1/10 µL Na asetat dari volume total supernatan yang didapat dan 6/10 µL isopropanol dari volume total supernatan yang didapat. Bolak balik ependorf sampai DNA mengendap, kemudian disentrifus 14000 rpm selama 5 menit. Pellet dicuci dengan etanol 70% selama 30 detik kemudian keringkan hingga etanol hilang. Pellet yang merupakan DNA tersebut kemudian dilarutkan dalam 25 µL buffer TE dan siap untuk deteksi gen menggunakan mesin PCR (Lampiran 4).

Tabel 2. Komponen-komponen dan campuran yang digunakan untuk gen *stx₁*

Pereaksi	Jumlah (µL)
<i>DNA Template (Genom DNA)</i>	1.0
<i>2.5 mM dNTP Mix solution</i>	2.5
<i>Primer 1</i>	1.25
<i>Primer 2</i>	1.25
<i>Taq Polymerase</i>	1
<i>Taq Buffer</i>	2.5
<i>ddH₂O PCR</i>	16.5
Volume Total	26 µL

Keterangan untuk gen *stx*₁

Primer 1 (EVT-1) : 5' -CAACACTGGATGATCTCAG-3'

Primer 2 (EVT-2) : 5'-CCCCCTCAACTGCTAATA-3'

Tiap-tiap komponen dimasukkan ke dalam tube PCR yang berisi template DNA, homogenkan dan masukkan ke mesin PCR yang telah dibuat program kerjanya

Tabel 3. Tahapan Kerja Mesin PCR Untuk deteksi gen *stx*₁ (33 siklus)

Siklus	Temperatur (°C)	Waktu (Menit)
1	94 ⁰	1
30	94 ⁰	1
	57.6 ⁰	1
	72 ⁰	2
1	72 ⁰	7
1	8 ⁰	∞

3.9 Elektroforesis untuk gen *stx*₁

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarose 1%. Gel ditambahkan Etidium Bromida sebelum dicetak . Elektroforesa menggunakan TBE 1x pada tegangan 100 Volt selama 30 menit. Selanjutnya dilihat hasil running di bawah lampu UV dengan menggunakan Gel Doc. Pada foto yang didapatkan pada Gel Doc dapat dilihat pola pemisahan pita-pita DNA yang ukurannya diketahui melalui perbandingan dengan ukuran pita-pita standar 1Kb DNA *ladder* sebanyak 5μL, dimana ukuran pita-pita DNA *E.coli* O157:H7 untuk gen *stx*₁ adalah 349 bp.

BAB IV

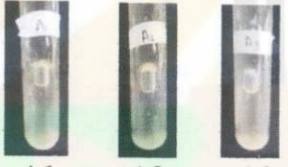

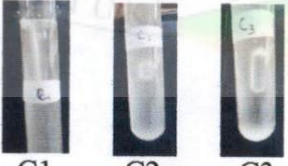
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Uji kualitatif Koliform dan Isolasi *Escherichia coli*

4.1.1 Uji Kualitatif Koliform (Metoda MPN)

Dari hasil uji koliform dengan metoda MPN, medium laktosa yang telah diinkubasi selama 24 jam hingga 48 jam menunjukkan adanya gas lebih dari 10% pada tabung durham, perubahan pH, dan kekeruhan. Ketiga hal ini harus ada untuk menunjukkan tabung positif bakteri koliform. Bakteri *Escherichia coli* memfermentasi laktosa sehingga terjadi perubahan pH dan gas. Perbedaan pH pada ketiga jenis tabung ini terjadi karena perbedaan jumlah bakteri yang difermentasi pada setiap tabung pengenceran, semakin kecil pengenceran semakin kurang asam hasil fermentasi laktosa ini.

Tabel 4. Uji Kualitatif Koliform dengan Metoda MPN

No	Tabung	Gas dan Kekeruhan	pH
1	 A1 A2 A3	+	A1 = 3.910 A2 = 3.784 A3 = 4.050
2	 B1 B2 B3	+	B1 = 4.982 B2 = 4.322 B3 = 4.997
3	 C1 C2 C3	+	C1 = 5.033 C2 = 5.117 C3 = 4.919



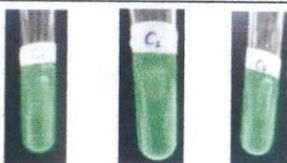
Pada 24 jam pertama, dari seri tabung 3 didapatkan hasil tabung seri positif 3-2-2, total 7 tabung yang telah memenuhi ketiga syarat diatas, 2 tabung yang lain belum memenuhi syarat positif karena jumlah gas yang terdapat pada tabung durham belum mencapai 10% dari tinggi tabung tersebut. Kemudian setelah 48 jam, ke 9

tabung menunjukkan positif adanya bakteri koliform dengan seri tabung positif 3-3-3 seperti yang ditunjukkan pada tabel 4. Seri tabung ini dicocokkan dengan tabel MPN (lampiran 6) sehingga didapatkan jumlah bakteri koliform ≥ 2400 MPN/100 mL. Berdasarkan SNI (lampiran 12), jumlah bakteri koliform yang diperbolehkan dalam ikan yang belum diolah adalah <3 MPN/100 mL. Tingginya jumlah bakteri ini menyebabkan masyarakat yang akan mengonsumsi ikan ini harus memperhatikan penanganan ikan ini. Cara penyimpanan dan pemasakan harus diperhatikan. Ikan harus dimasak dengan suhu diatas 70°C .¹⁹

4.1.2 Uji Kualitatif Fecal Koliform

Ke 9 tabung positif pada medium laktosa diinokulasikan sebanyak 2 loop pada medium BGLBB dan telah dinkubasi selama 24 jam dengan suhu 44.5°C menunjukkan adanya kekeruhan (Tabel 5). Hal ini menunjukkan bahwa tabung-tabung tersebut positif bakteri fecal koliform. Laktosa yang terkandung dalam medium BGLBB difermentasikan oleh bakteri *E.coli* sehingga larutan menjadi keruh karena adanya gas yang dihasilkan dari proses tersebut.

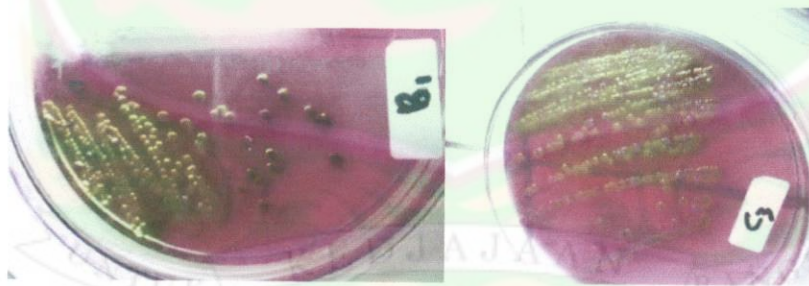
Tabel 5. Uji Kualitatif Feacal Koliform

No	Tabung	Gas dan Kekeruhan
1	 A1 A2 A3	+
2	 B1 B2 B3	+
3	 C1 C2 C3	+

Bile (empedu) dan zat warna hijau yang terdapat pada BGLBB berguna untuk menghambat pertumbuhan organisme gram positif, sehingga hanya bakteri *E.coli* yang merupakan bakteri gram negatif yang tumbuh. Suhu yang digunakan yaitu 44.5°C merupakan suhu usus hewan berdarah panas yang merupakan habitat normal bakteri *E.coli*, sehingga hanya bakteri fekal koliform yang dapat tumbuh.

4.1.3 Isolasi *Escherichia coli*

Dari tabung-tabung positif fekal koliform, diinokulasikan pada medium Endo Agar. Bakteri *E.coli* akan membentuk warna kemilau metalik (Gambar 4). Hasil dari tabung A, bakteri *Escherichia coli* yang menunjukkan warna hijau metalik terlihat pada bagian A1 namun tidak membentuk koloni tunggal, sedangkan pada A2 dan A3 tidak terlihat adanya warna hijau kemilau metalik yang menandakan *Escherichia coli* tidak terdapat pada tabung ini. Hasil dari inokulasi tabung B, ketiga petri menunjukkan adanya bakteri *Escherichia coli*, pada B1 dan B2 terdapat koloni tunggal sedangkan pada B3 tidak terdapat koloni tunggal. Hasil dari inokulasi tabung C, Ketiga petri menunjukkan adanya bakteri *Escherichia coli*, pada C1 dan C3 terdapat koloni tunggal sedangkan pada C2 tidak terdapat koloni tunggal. Koloni tunggal tidak terbentuk disebabkan karena adanya bakteri lain yang menumpuk dan tidak terpisah sempurna. Warna medium sebelum digunakan adalah merah muda (Lampiran 7)

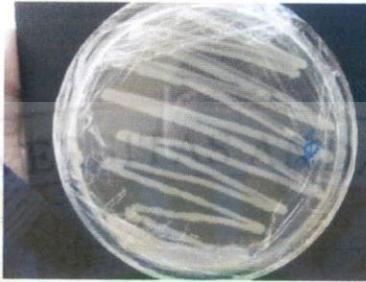


Gambar 4. *Escherichia coli* pada medium Endo Agar untuk B1 dan C3

Pada medium endo agar terdapat Natrium sulfit dan fuchsin berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan bakteri Gram positif. Warna koloni merah disebabkan bakteri *E. coli* dan koliform memetabolisme laktosa menjadi aldehid dan asam sehingga aldehid bereaksi dengan fuchsin. Koloni kilap logam disebabkan *E.coli* bereaksi dengan fuchsin kristal sehingga fuchsin tersebut diserap.

4.1.4 Pemurnian *Escherichia coli*

Koloni tunggal yang terdapat pada medium endo agar, dimurnikan dengan medium Tryptic Soy Agar (Gambar 5). Lima koloni diambil dari petri yang memiliki koloni tunggal yaitu B1, B2, C1 dan C3. Dua koloni diambil dari satu petri yang sama yaitu B2 (B21 dan B22) sehingga didapatkan 5 kultur bakteri.



Gambar 5. Pemurnian *Escherichia coli* pada medium TSA

4.2 Uji Biokimia Bakteri *Escherichia coli*

Uji indol yang telah dilakukan pada ke 5 sampel menunjukkan positif bakteri *Escherichia coli*, dilihat dari terbentuknya cincin merah pada bagian atas medium fermentasi setelah penambahan reagen Kovac's (Lampiran 9). Uji Indol menggunakan media Tryptone Broth dan penambahan larutan Kovac's. Dimana larutan Kovac's mengandung amil alkohol sehingga adanya indol akan menyebabkan amil alkohol berubah warnanya menjadi merah. Uji indol menunjukkan bahwa bakteri yang tergolong dalam grup fekal yaitu *E. coli* dapat memecah asam amino triptofan. Adanya enzim triptopanase pada bakteri ini akan memecahkan asam amino triptopan dan amoniak. Dalam metabolismenya bakteri ini menggunakan tryptopan sebagai sumber energi. Indol adalah produk sisa dengan bau fecal.³⁰

Uji laktosa yang merupakan salah satu uji karbohidrat menunjukkan bahwa ke 5 kultur positif bakteri *Escherichia coli*. Medium laktosa yang digunakan berubah warna, dari merah bata menjadi kuning, hal ini menunjukkan adanya proses fermentasi yang dilakukan oleh bakteri *Escherichia coli* (Lampiran 9). Kemampuan memfermentasikan berbagai karbohidrat dan produk fermentasi yang dihasilkan merupakan ciri yang sangat berguna dalam identifikasi mikroorganisme. *Escherichia coli* menggunakan laktosa sebagai sumber karbon. Perubahan warna medium menjadi kuning disebabkan karena terdapatnya indikator brom timol blue (BTB) dalam medium. Dimana penambahan indikator BTB ke dalam medium yang mengalami

fermentasi karbohidrat jadi asam dalam keadaan aerob, maka pH akan turun dan akhirnya indikator BTB ini akan berubah warna menjadi kuning.³⁰

Ke 5 kultur yang telah diinokulasikan pada medium *Simmon's Citrate Agar*, tidak menunjukkan adanya perubahan warna medium yang bewarna hijau dan tidak tumbuhnya bakteri *E.coli* (negatif uji sitrat) (Lampiran 9). Uji sitrat ini bertujuan untuk mengetahui penggunaan sitrat sebagai sumber karbon. Dari uji yang dilakukan diperoleh hasil yang negatif berarti *E. coli* tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Bakteri *Escherichia coli* dapat menggunakan asetat sebagai sumber karbon, tetapi tidak dapat menggunakan sitrat.³⁰

Berdasarkan uji-uji ini (Tabel 6), dapat dipastikan bahwa kultur ini positif bakteri *Escherichia coli*.

Tabel 6. Uji Biokimia 5 kultur Bakteri *Escherichia coli*

	Uji Laktosa	Uji Indol	Uji Sitrat
B1	+	+	-
B21	+	+	-
B22	+	+	-
C1	+	+	-
C3	+	+	-

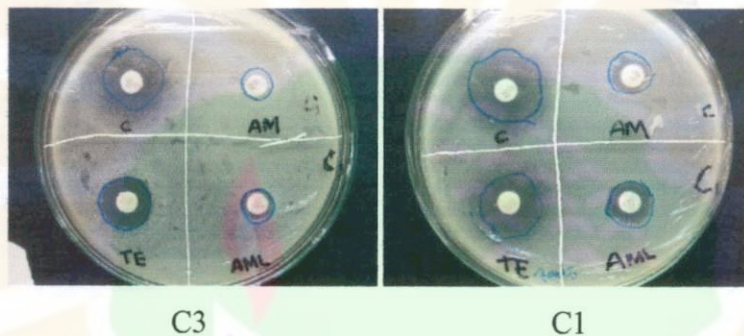
Keterangan : + = uji positif, - = uji negatif

4.3 Uji resistansi terhadap antibiotik

Setelah dilakukan uji identifikasi, dilakukan uji resistensi bakteri yang ditemukan terhadap beberapa antibakteri dengan menggunakan metode difusi agar. Bakteri ditanam di media MHA, dengan metoda tuang. Selanjutnya ditaruh keempat disk antibakteri dengan jarak yang sama. Antibakteri akan berdifusi ke media agar sehingga menghambat pertumbuhan bakteri. Zona hambat berupa zona bening yang terbentuk diukur dan dibandingkan dengan standar untuk menentukan sifat resistensi bakteri.

Antibiotik yang digunakan adalah, *amoxicilin*, *ampicilin*, *tetracyclin* dan *chloramphenicol*. Keempat antibiotik ini sangat mudah didapatkan dan banyak ditemukan telah resistan terhadap bakteri patogen. Pada tabel 7, halozone yang terbentuk paling besar terdapat pada petri B22 dengan antibiotik *amoxicillin* dan petri

C1 pada antibiotik *chloramphenicol* (Lampiran 10). Resistansi yang paling besar terdapat pada antibiotik ampicilin pada petri C1 dan C3 (Gambar 6). Hasil yang didapatkan, *amoxicillin* memiliki 2 kultur resistan, 2 kultur intermediet dan 1 kultur susceptible, *ampicilin* memiliki 2 kultur resistan, 2 kultur intermediet dan 1 kultur susceptible, pada *chloramphenicol* tidak terdapat kultur yang resistant, 2 kultur intermediet dan 3 kultur susceptible; pada *tetracyclin* terdapat 2 kultur yang resistan, 3 kultur intermediet, tidak ada kultur susceptible. Berdasarkan persentasi, 30% kultur resistant, 45% intermediet dan 25 % susceptible terhadap keempat antibiotik (Tabel 8).



Gambar 6. Uji resistansi *Bakteri Escherichia coli* pada C1 dan C3, AM = ampicilin, AML = Amoxicilin, C= Chloramphenicol, TE = Tetracyclin

Tabel 7. Hasil halozone dalam millimeter (mm)

Antibiotik /No. Petri	<i>Amoxicilin</i> (AML)	<i>Ampicilin</i> (AM)	<i>Cloramphenicol</i> (C)	<i>Tetracyclin</i> (TE)
B1	13.5	14	13	14
B21	16	14.5	18.75	13.25
B22	20.5	18.5	19	17.5
C1	12.75	11	20.25	18.25
C3	9.75	9	16.75	15.25

Berdasarkan tabel 8, kategori sensifitas tertinggi pada kategori intermediet, hal ini menunjukkan bahwa antibiotik yang biasa digunakan untuk diare ini sudah mengalami penurunan efektifitas. Dalam kategori ini antibiotik tidak dapat dipastikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang dituju. Kategori resistant yang walaupun tidak terlalu tinggi perlu diwaspadai, karena bila penggunaan antibiotik

masih tidak memenuhi standar yang ditetapkan, persen kategori ini dapat menjadi lebih tinggi.

Tabel 8. Total kultur berdasarkan jenis antibiotik dan kategori

No	Nama Antibiotik	Resistant	Intermediet	Susceptible
1	<i>Amoxicilin</i>	2	2	1
2	<i>Ampicilin</i>	2	2	1
3	<i>Cloramphenicol</i>	-	2	3
4	<i>Tetracyclin</i>	2	3	-
Total		6 (30%)	9 (45%)	5 (25%)

Kelemahan *penicillin* (*amoxicillin* dan *ampicillin*) adalah sifatnya yang berspektrum sempit dan peka terhadap penisilinase (β -laktamase), yaitu enzim yang diproduksi oleh bakteri terutama *Staphylococcus* yang dapat mematahkan cincin β -laktam pada molekul penisilin. Pada bakteri *Escherichia coli*, β -laktamase dihasilkan dalam konsentrasi rendah dan terikat pada membrane luar. Enzim ini mencegah antibiotik β -laktam untuk mencapai target pada membran sitoplasma dengan cara merusaknya saat antibiotik tersebut melewati membrane luar dan lapisan periplasma. Gen yang mengkode β -laktamase terdapat pada kromosom bakteri, pada beberapa strain bakteri juga terdapat pada plasmid dan transposon. Sebagian besar bakteri resisten penisilin juga memiliki gen β -laktamase pada plasmid, terutama plasmid R dan transposon.²⁴

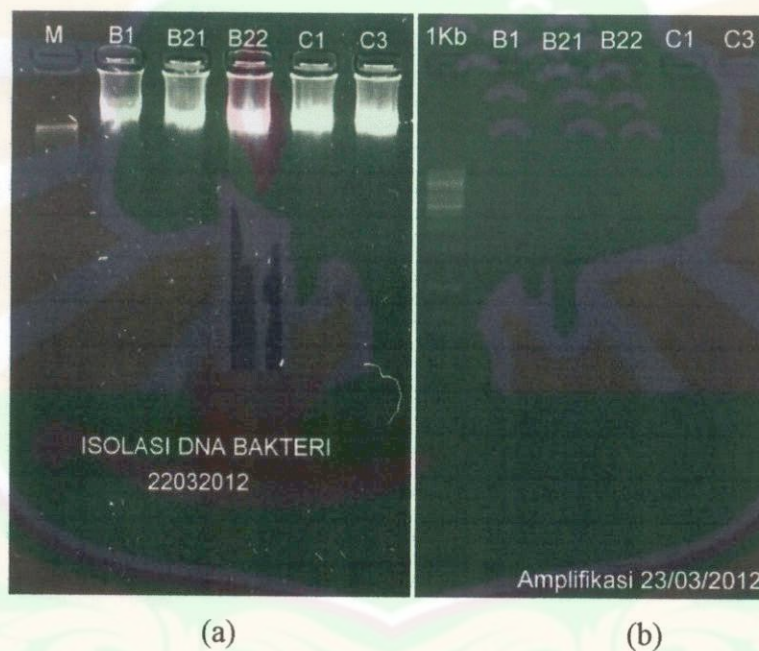
Resistansi yang terjadi pada *tetracycline* muncul bila dihasilkan membrane sitoplasma (bentuk perubahan) dan mencegah pengikatan *tetracycline* pada subunit 30S ribosom, sehingga seintesis protein dapat terus berlangsung. Mekanisme resistansi *tetracycline* lainnya adalah resistansi pompa efflux, didasarkan atas transport *tetracycline* keluar sel secara cepat, sehingga mencegah akumulasi *tetracycline* pada dosis toksik, sehingga sintesis protein bakteri tidak terhambat. Hal ini terjadi akibat adanya mutasi pada gen yang menyebabkan dihasilkan protein efflux *tetracycline*.²⁴

Resistansi yang menjadi perhatian dunia saat ini, diakibatkan karena penggunaan antibiotik yang tidak rasional, Dr. Sharad Adhikary dari WHO menyatakan bahwa kekebalan kuman membuat kita bisa kembali ke era sebelum

antibiotik ditemukan. Antibiotik hanya menyembuhkan penyakit akibat infeksi bakteri. Bakteri mampu bermutasi sehingga tahan antibiotik. Andhikary mencontohkan kemunculan “Super Bug” (bakteri yang tak dapat dilemahkan) oleh antibiotik mutakhir. Pengobatan infeksi oleh bakteri yang kebal antibiotik menjadi amat mahal karena membutuhkan antibiotik lebih mutakhir dengan efek samping lebih besar serta pengobatan lebih panjang.³¹

4.4 Isolasi DNA dan Karakterisasi Strain *Escherichia coli*

Untuk mendeteksi gen *stx₁* yang merupakan salah satu gen pendeteksi bakteri *Escherichia coli* O157:H7 yang terdapat pada kelima kultur dilakukan dengan metoda amplifikasi. Perlakuan awal dilakukan dengan mengisolasi DNA (lampiran 3) dengan metoda *Jeff Newman*.



Gambar 7. (a) Hasil elektroforesis isolasi DNA *Escherichia coli*, M = lamda
(b) Hasil Amplifikasi lima kultur *Escherichia coli*, M= 1 Kb

Hasil elektroforesis menunjukkan konsentrasi DNA hasil isolasi (gambar 7a). Intensitas dari kelima sampel dibandingkan dengan intensitas marker atau lamda. Konsentrasi DNA hasil isolasi dihubungkan dengan intensitas marker yang digunakan, konsentrasi lamda yang digunakan adalah 100 ng/μL. Untuk B1 dan B21, diperkirakan intensitas yang didapatkan adalah 15 kali lamda sehingga didapatkan konsentrasi DNA hasil isolasi diperkirakan sebesar 1500 ng/μL, sedangkan ke tiga kultur DNA lainnya memiliki intensitas 20 kali lamda sehingga didapatkan

konsentrasi DNA 2000 ng/ μ L. DNA ini kemudian diencerkan untuk digunakan sebagai templete pada PCR untuk amplifikasi. Berdasarkan hasil elektrophoresis yang sebelumnya telah diamplifikasi dengan primer *stx*₁ (Gambar 7b), tidak ditemukan pita-pita DNA amplicon yang menunjukkan ukuran dari DNA tersebut. Ukuran DNA yang diharapkan adalah 349 bp. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat gen *stx*₁ pada bakteri *Escherichia coli* hasil isolasi dari ikan balang, yang menandai adanya bakteri *Escherichia coli* O157:H7.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, didapatkan jumlah bakteri koliform dan fekal koliform (*Escherichia coli*) berdasarkan metoda MPN adalah ≥ 2400 MPN/100mL (Standar SNI <3 MPN/100 mL). Uji biokimia yang telah dilakukan menunjukan 5 kultur merupakan bakteri *Escherichia coli*. Hasil uji biokimia didapatkan uji laktosa dan uji indol positif sedangkan uji sitrat negatif. Pola resistansi antibiotik terhadap *Escherichia coli* dalam persen adalah 30% kultur resistant, 45% intermediet dan 25 % susceptible terhadap keempat antibiotik (*ampicilin, amoxicilin, tetracyclin dan chloramphenicol*). Hasil deteksi gen *stx*₁ pada 5 kultur Bakteri *Escherichia coli* patogen yaitu *Escherichia coli* O157:H7, tidak ditemukan berdasarkan hasil amplifikasi.

5.2 Saran

Disarankan agar permasalahan mengenai pencemaran di Sungai Batang Arau menjadi perhatian semua kalangan di kota Padang. Tingginya jumlah bakteri ini menyebabkan masyarakat yang akan mengonsumsi ikan ini harus memperhatikan penanganan ikan ini. Cara penyimpanan dan pemasakan harus diperhatikan. Tingkat kontaminasi bakteri dengan manusia yang dapat menyebabkan penyakit perlu diwaspadai karena pola resistansi antibiotik dari bakteri patogen yang cukup tinggi. Selain itu, penelitian mengenai penyebaran bakteri patogen *Echerichia coli* O157:H7 juga dapat ditingkatkan lagi pada jenis bahan makanan lain dan gen pendeteksi yang lain seperti *stx*₂, *eae* dan *fliCH7*.

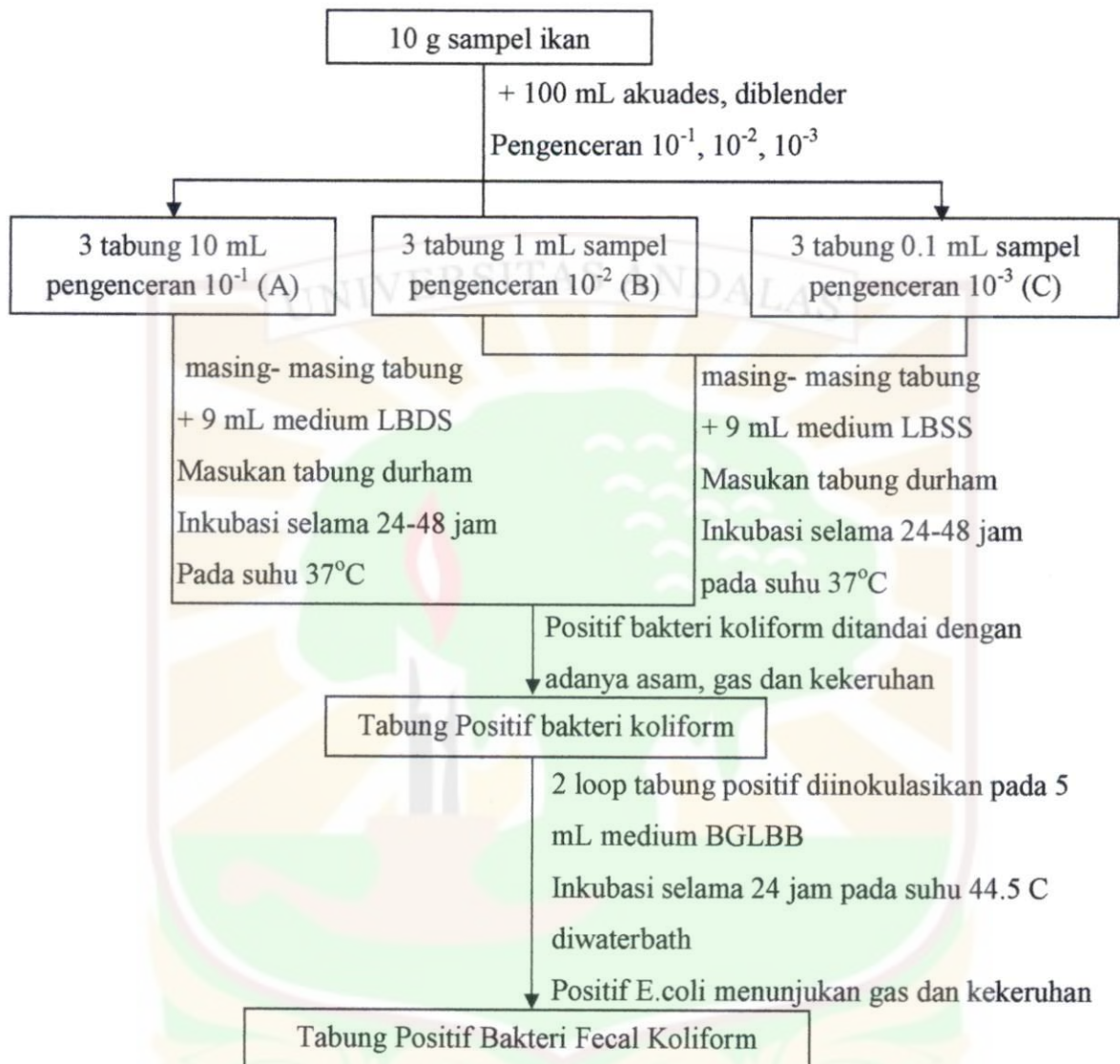
DAFTAR PUSTAKA

1. I. Chahaya. Ikan sebagai Alat Monitor Pencemaran. Bagian Kesehatan Lingkungan Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sumatera Utara. *USU digital library*.(2003)
2. A.E Putri. *Kondisi Jantung dan Nilai Darah Ikan Nila (Oreochromis niloticus L.) yang Terdapat di Batang Arau Kota Padang*. Skripsi Sarjana Biologi Padang : Universitas Andalas (2010).
3. L. Novotny, L Dvorska, A.Lorencova, V. Beran and I. Pavlik. Fish: a Potential Source of Bacterial Pathogens for Human Being. *Rewiew Article Vet. Med. – Czech*,49(9).2004. pp. 343–358.
4. L. Beutin, S. Zimmerman and K. Gleier. Human Infections with Shiga Toxin Producing *Eschericia coli* other than serogroup O157 in Germany. *Emerging Infectious Diseases*. 4, 4.1998. pp. 635-639.
5. A. Pruss, E.Giroult. 2005. *Pengelolaan Aman Limbah Layanan Kesehatan*. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 2005.
6. Z. Zaini. *Efektifitas Pengolahan Limbah Rumah Sakit Umum Pusat Dr.M.Djamil Padang*. Tesis Pasca Sarjana. Universitas Andalas (2002).
7. H.S Kumar, A. Parvathi, I. Karunasagar and I.Karunasagar. Prevalence and Antibiotik Resistance of *Eschericia Coli* in Tropical Seafood. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Springer (2005).
8. Refdanita, Maksum, Nurgani, Endang. Pola Kepekaan Kuman Terhadap Antibiotika di Ruang rawat Intensif Rumah Sakit Fatmawati. *Makara, Kesehatan* Vol. 8 No. 2. 2001. hal 41-48.
9. Dwiprasto, Iwan, Erna Kristin. Improvin The Use of Antibiotik in Primary Health Centers Through a Problem Based Pharmacotherapy Training Approach. *Berkala Ilmu Kedokteran* Vol.35, No.3. (2003) Gajah Mada University
10. Fadil, Muhammad Syukri. *Kajian Beberapa Aspek Parameter Fisika Kimia Air Dan Aspek Fisiologis Ikan Yang Ditemukan Pada Aliran Buangan Pabrik Karet Di Sungai Batang Arau*.Tesis Pasca Sarjana. Universitas Andalas (2011).
11. Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia www.kkp.go.id

12. Jawetz, Melnick, Adelberg. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran (Edisi 1)*. Penerjemah: Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta.2001. hal 224-230.
13. N.T Perna, G.P. Ill, V. Burland, B. Mau, J.D Glasner, D.J Rose, G.F Mayhew, P.S Evans, J. Gregor, H.A Kirkpatrick. Genome Sequence of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529-31.(2001).
14. C. Su, L.J Brandt. *Escherichia coli* O157: H7 infection in humans. *Annals Internal Med* 123(9). 1995.pp.698-707.
15. G.L Armstrong, J. Hollingsworth, G.J Morris. Emerging Foodborne Pathogens : *Escherichia coli* O157:H7 as a Model of Entry of a New Pathogen Into the Food Supply of the Developed World. *Epidemiologic Reviews*. 16, 1,1996. pp.29-46.
16. C.K Audrey, Kristin, F. B. Breidt Jr, H. Hassan . Effects of pH Dissolved Oxygen and Ionic Strength on The Survival of *Escherichia coli* O157:H7 In Organic Acid Solutions. *Journal Of Food Protection*. 71, 12. 2008. pp. 2404–2409.
17. N.H Dini. *Deteksi Gen eae, stx₁, stx₂ dari Bakteri Escherichia coli O157:H7 pada Ikan Lele Dumbo (Clarias garlepinus) dengan menggunakan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction)*. Skripsi Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. (2010)
18. H. Nirwati, S.Iravati, M. Aria, A.I Putu, M. Restu, R. Rendy. The use of bacteriophage therapy for curing the *Escherichia coli* O157 infection in mice. *Berkala Ilmu Kedokteran*. 40.2008. pp. 119-124.
19. A.A Djamal, Marlina, Yuherman. *Karakterisasi Gen Penghasil Toksin Pada Bakteri Patogen Escherichia coli O157 Dalam Rangka Penanggulangan Penyakit Diare Berdarah pada Masyarakat*. Skripsi Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. (2009)
20. S. Wahyudi. *Deteksi Gen Patogenik Bakteri Escherichia coli O157:H7 Dan Vibrio Parahaemolyticus dari Sampel Lokan (Batissa violacea) Dengan Metoda PCR (Polymerase Chain Reaction)*, Skripsi Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. (2009)
21. R.F. Sari. *Isolasi dan Deteksi Gen stx₁ dan stx₂ dari bakteri Escherichia coli O157:H7 pada sampel Langkitang (faunus ater) dan Pensi (Corbicula moltkiana*

- Prime) dengan metoda Polymerase Chain Reaction (PCR).* Skripsi. Universitas Andalas. (2009)
22. A.W Paton, J.C Paton. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 11, 3, p450-471. (1998)
 23. S.G Ganiswara. *Farmakologi dan Terapi*. (4th Ed). Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2005. hal.575-593
 24. S.T Pratiwi. *Mikrobiologi Farmasi*. Penerbit Erlangga. Jakarta. 2008. hal 154-167
 25. H.S. Kumar. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in Fresh Seafood and Meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 33. 2001. pp. 334-338
 26. J. Sambrook, D.W. Russel D.W. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Volume 1. Third Edition. CSHL Press. New York. 2001
 27. P.A.Kumar. Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents and Microbiological Quality among *Escherichia coli* Isolated from Dry Fishes in Southeast Coast of India. *Roumanian Biotechnological Letters* Vol. 13 No. 6. 2008. pp. 3984-3989.
 28. M.A. Akond, S.M.R. Hassan, S. Alam & M. Shirin. Antibiotic Resistance of *Escherichia Coli* Isolated From Poultry and Poultry Environment of Bangladesh. *American Journal of Environmental Sciences* 5 (1). 2009 . pp. 47-52.
 29. Jamsari. *Bioteknologi Pemula, Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. Unri press. Riau. 2007. Hal 59-75
 30. Fatchiyah. *Polimerase Chain Reaction (Dasar Teknik Amplikasi DNA dan Aplikasinya)*. Unibraw. Malang. 2006.
 31. A. Agusta. *Biologi dan Kimia Jamur Endofit*. Penerbit ITB. Bandung. 2009. Hal 11-17
 32. D.H Bergey. *Bergey's Manual of Determinative Bacterology*. The Williams & Wilkins Company. USA. 1957
 33. L.K Anna. Penggunaan Antibiotik Makin Mengkhawatirkan. *Koran Kompas edisi 28 Maret 2011*

Lampiran 1. Skema kerja uji Kualitatif Koliform (Metoda MPN) dan Isolasi *Escherichia coli*



Tabung Positif Bakteri fecal Koliform

Diinokulasikan ke medium Endo Agar
Positif *E.coli* menunjukan warna hijau
metalik

Koloni *E.coli*

Dimurnikan dengan
menginokulasikan ke medium TSA

5 kultur *E.coli*

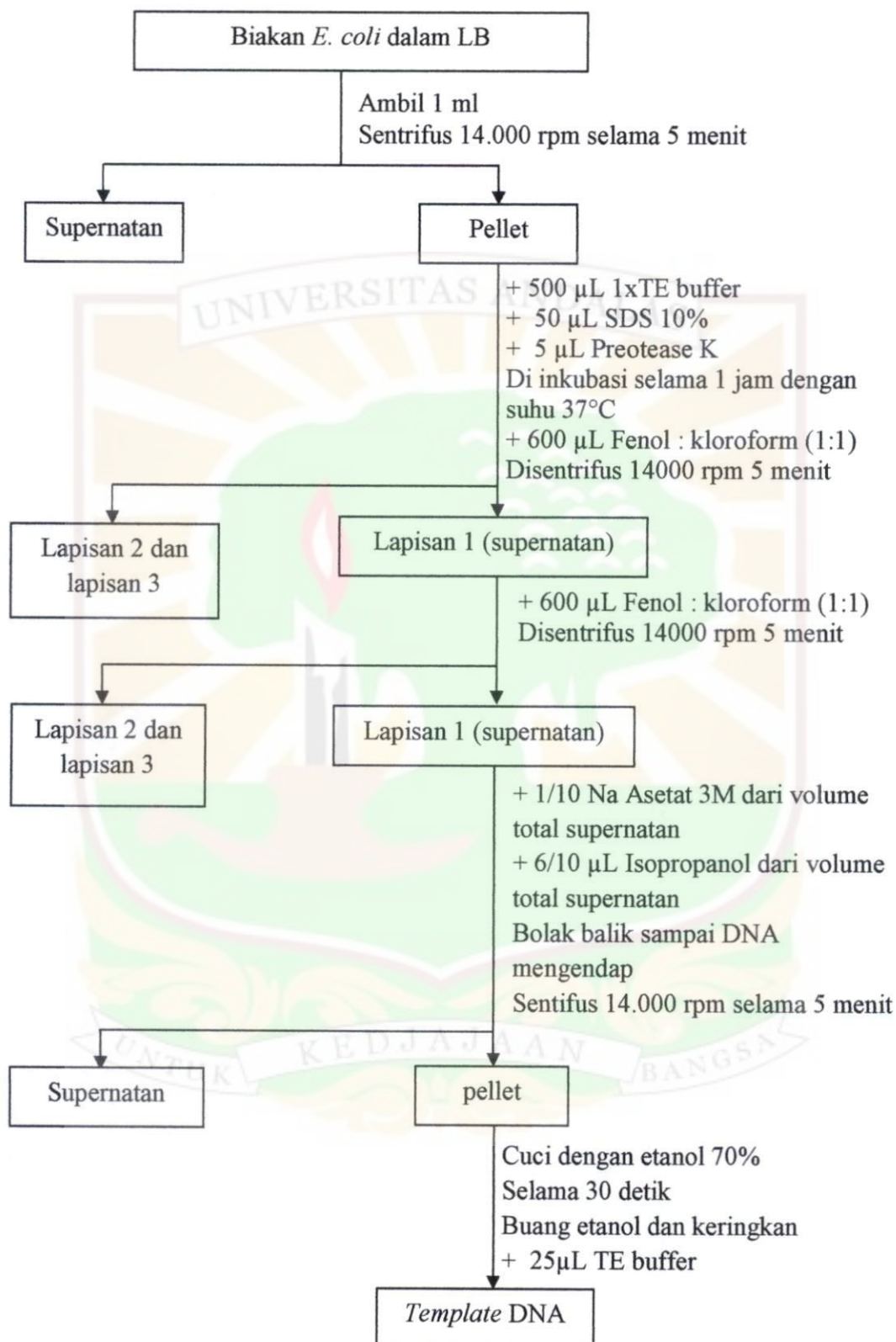
Uji biokimia untuk identifikasi *E.coli*



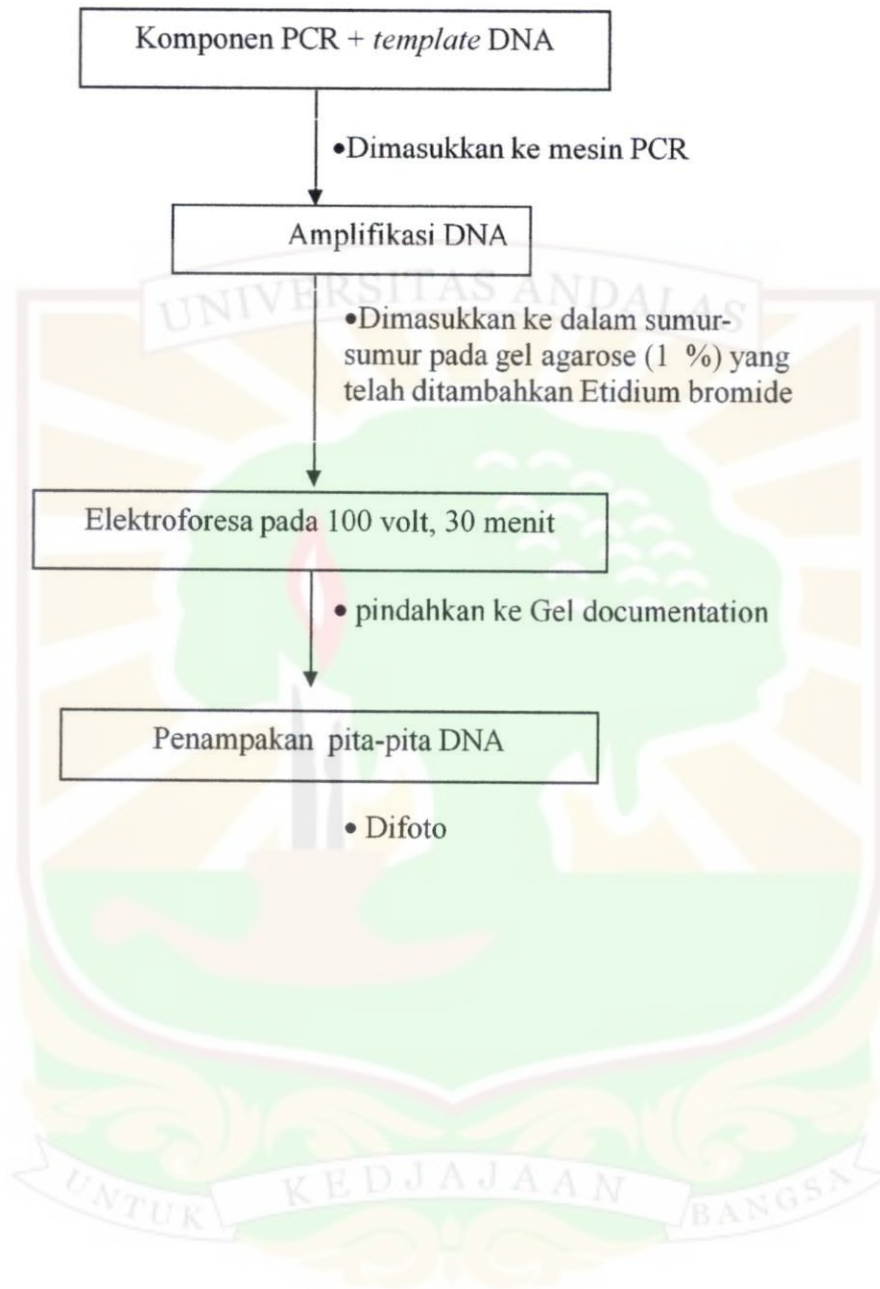
Lampiran 2. Skema Kerja Uji Resistansi Antibiotik



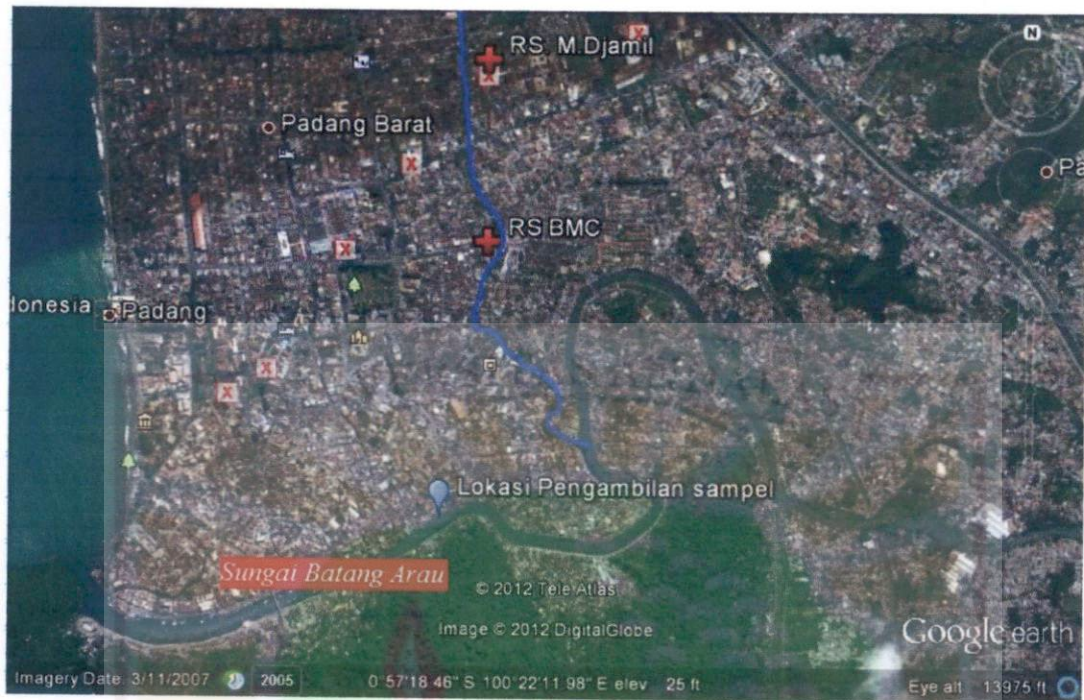
Lampiran 3. Skema kerja isolasi DNA Metoda *Jeff Newman*



Lampiran 4. Skema Kerja Pendeteksian gen *stx*₁ pada Bakteri *E.coli*



Lampiran 5. Lokasi Pengambilan Sampel



Gambar 8. Lokasi Pengambilan Sampel

Keterangan :

— : Aliran air

+ : Rumah Sakit

📍 : Lokasi Pengambilan Sampel

Lampiran 6. Tabel MPN (Tabel J.K Hosin)

Volume			Nilai MPN (/100 mL)
Tabung A = 10 mL	Tabung B = 1 mL	Tabung C = 0.1 mL	
0	0	1	< 3
0	1	0	3
0	1	1	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	≥ 2400

Rumus Perhitungan MPN :

$$\text{MPN/g} = \frac{(\sum g_i)}{(\sum t_i m_i \sum (t_i - g_i) m_i)^{(1/2)}}$$

$\sum g_i$ = jumlah tabung positif pada pengenceran yang dipilih

$\sum t_i m_i$ = jumlah (g/ml) dari sampel dalam semua tabung pada pengenceran yang dipilih

$\sum (t_i - g_i) m_i$ = jumlah (g/ml) dari sampel pada dalam tabung negatif pada pengenceran yang dipilih

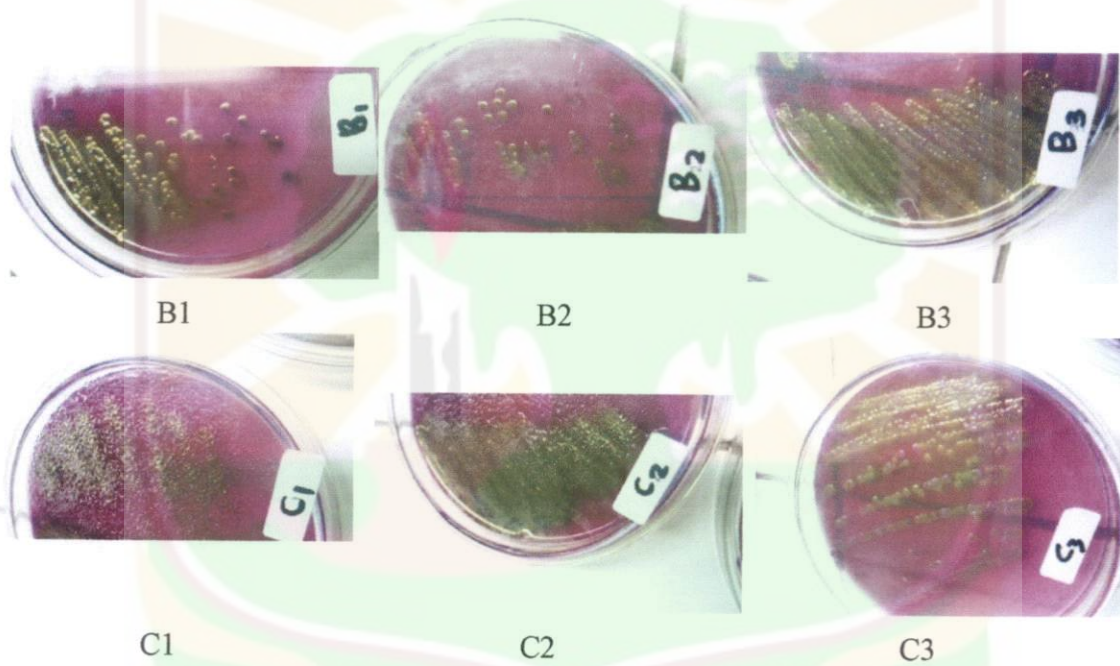


Lampiran 7. Isolasi dan Pemurnian *Escherichia coli*

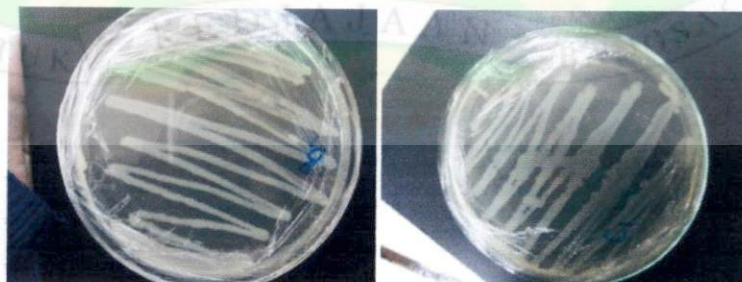


A1 dan A2

A3



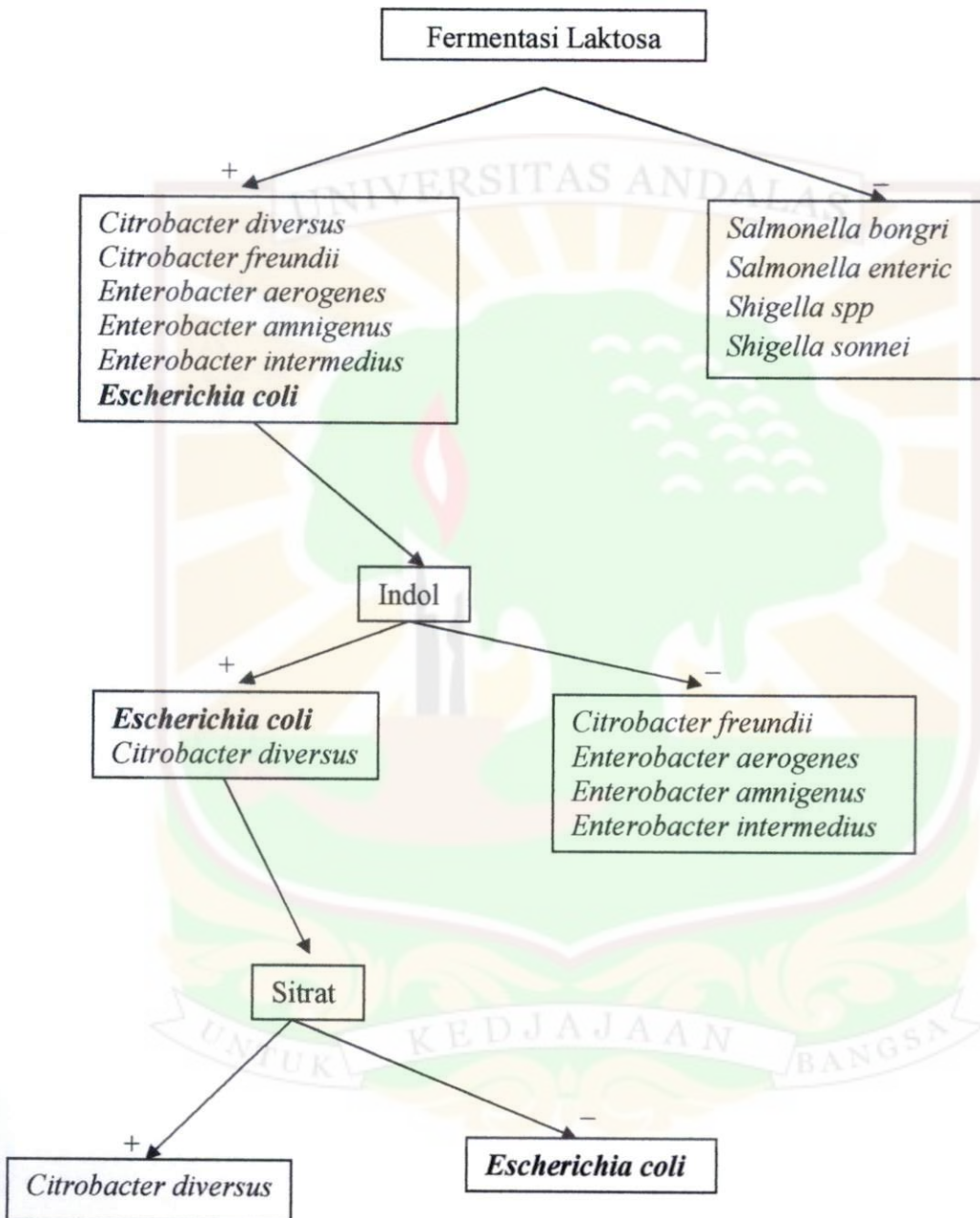
Gambar 9. *Escherichia coli* pada medium Endo Agar



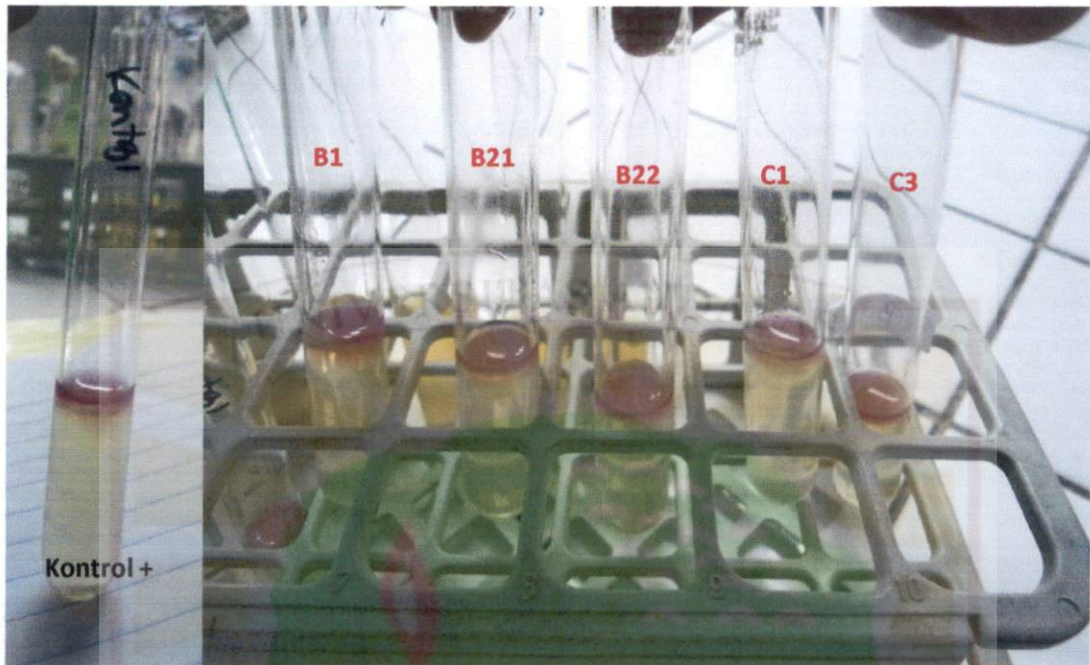
Gambar 10. Pemurnian *Escherichia coli* pada medium TSA

Lampiran 8. Flowchart *Bergey's Manual of Determinative Bacterology* untuk Identifikasi bakteri *E.coli* secara Biokimia

Family Enterobacteriaceae



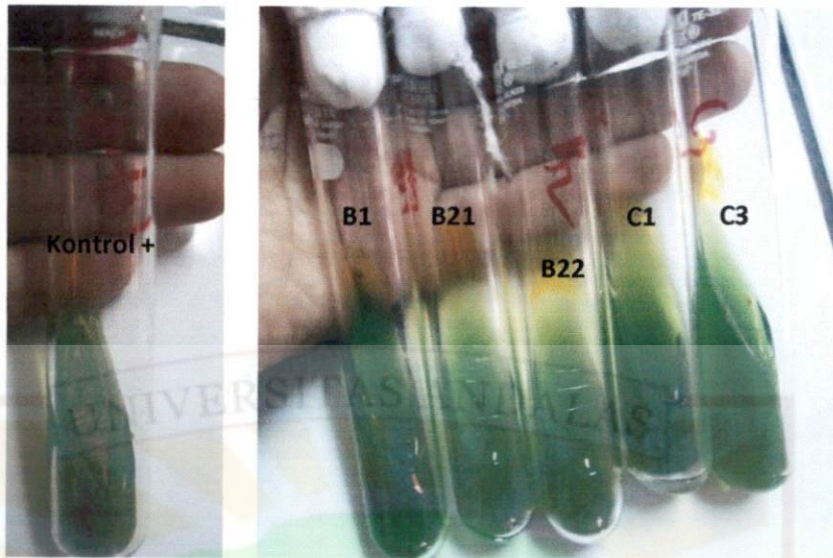
Lampiran 9. Uji Biokimia *Escherichia coli*



Gambar 11. Uji Indol + (positif) dengan adanya cincin merah



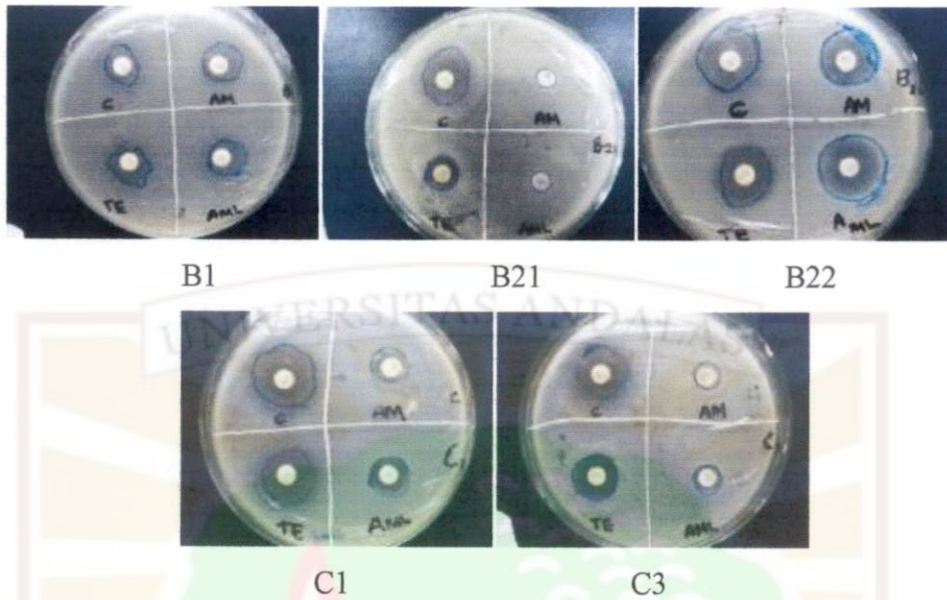
Gambar 12. Uji Laktosa + (positif) dengan perubahan warna medium menjadi kuning



Gambar 13. Uji Sitrat – (negatif) tidak berubahnya warna medium



Lampiran 10. Uji resistansi antibiotik



Gambar 14. Halozone yang terbentuk dari 5 kultur

Keterangan :

AM = *ampicilin*

AML = *amoxicilin*

C = *cloramphenicol*

TE = *tetracyclin*

Lampiran 11. Standar Antibiotik

Tabel 9. Standar besar halozone berdasarkan BBL (mm)

No	Nama Antibiotik	Resistant	Intermediet	Susceptible
1	<i>Ampicilin</i>	≤ 13	14 -16	≥ 17
2	<i>Amoxicilin</i>	≤ 13	14 -17	≥ 18
3	<i>Cloramphenicol</i>	≤ 12	13 -17	≥ 18
4	<i>Tetracyclin</i>	≤ 14	15 -18	≥ 19



Lampiran 12: Standar SNI (Standar Nasional Indonesia) 7388:2009

	Sosis masak (tidak dikalengkan, siap konsumsi)	ALT (30 °C, 72 jam)	1 x 10 ⁴ koloni/g
		APM Koliform	< 3/g
		<i>Salmonella</i> sp.	negatif/25 g
		<i>Staphylococcus aureus</i>	1 x 10 ² koloni/g
		<i>Clostridium perfringens</i>	10 koloni/g
		<i>Listeria monocytogenes</i>	negatif/25 g
	Corned beef dalam kaleng, sosis dalam kaleng	ALT (30 °C, 72 jam)	1 x 10 ² koloni/g
		<i>Clostridium perfringens</i>	negatif/g
09.0	Ikan dan produk perikanan termasuk moluska, krustase dan ekinodermata		
09.1	Ikan dan produk perikanan segar, termasuk moluska, krustase dan ekinodermata		
09.1.1	Ikan segar	ALT (30 °C, 72 jam)	5 x 10 ⁵ koloni/g
		APM <i>Escherichia coli</i>	< 3/g
		<i>Salmonella</i> sp.	negatif/25 g
		<i>Vibrio cholerae</i>	negatif/25 g
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	negatif/25 g
09.1.2	Moluska, krustase dan ekinodermata segar	ALT (30 °C, 72 jam)	5 x 10 ⁵ koloni/g
		APM <i>Escherichia coli</i>	< 3/g
		<i>Salmonella</i> sp.	negatif/25 g
		<i>Vibrio cholerae</i>	negatif/25 g
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	negatif/25 g

Copy standar ini dibuat untuk penayangan di website dan tidak

